

15This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 05 July 2001 (05.07.01)	
International application No. PCT/JP00/06987	Applicant's or agent's file reference KRK-106PCT
International filing date (day/month/year) 06 October 2000 (06.10.00)	Priority date (day/month/year) 06 October 1999 (06.10.99)
Applicant MIYATA, Toshio	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

23 March 2001 (23.03.01)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer H. Zhou Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/089789

Applicant's or agent's file reference KRK-106PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/06987	International filing date (day/month/year) 06 October 2000 (06.10.00)	Priority date (day/month/year) 06 October 1999 (06.10.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 31/155, A61P 43/00		
Applicant MIYATA, Toshio		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 23 March 2001 (23.03.01)	Date of completion of this report 12 July 2001 (12.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06987

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06987

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet for continuation of Box IV. 3.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/06987

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

This application includes the following two groups of inventions.

Claims 1 and 2: inventions relating to agents for relieving carbonyl stress, in which the active ingredient is a biguanide; and

Claims 3-5: inventions relating to carriers having a biguanide immobilized thereon, application thereof and methods for using the same.

The only feature common to the inventions set forth in Claims 1 and 2 and the inventions set forth in Claims 3-5 is biguanides; however, biguanides are known. Therefore, there is no technical relationship between these two groups of inventions which involves a special technical feature that defines a contribution to the prior art, and they are not so linked as to form a single general inventive concept.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/06987

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 2, 4, 5	YES
	Claims	3	NO
Inventive step (IS)	Claims	4, 5	YES
	Claims	1-3	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Yasushi Tanaka et al, "Inhibitory effect of metformin on formation of advanced glycation end products", Current Therapeutic Research, Vol. 58, No. 10 (1997), pp. 693-697

Document 2: Yoshinari Yasuda et al., "Carbonyl stress. A new development of advanced glycation end products", Gendai Igaku, Vol. 45, No. 2 (1997), pp. 363-368

Document 3: G. T. Layton et al., "Factors influencing the immunogenicity of the haptenic drug chlorhexidine in mice. Part I. Molecular requirements for the induction of IgE and IgG anti-hapten antibodies", Molecular Immunology, Vol. 24, No. 2 (1987), pp. 133-141

Claims 1 and 2

Document 1 discloses the inhibitory effect of metformin on the formation of advanced glycation end products (AGE), and notes that guanidine and biguanide are rich in amino groups, and that aminoguanidine hydrochloride (AG) reacts with dicarbonyl metabolites to inhibit the formation of advanced glycation end products (AGE) and suppress the Maillard reaction (page 693, line 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

from bottom to page 694, line 2).

Similarly, Document 2 discloses production of carbonyl stress by carbonyl compounds.

Given this, a person skilled in the art could easily conceive of investigating the use of a biguanide to alleviate carbonyl stress by reacting with the carbonyl compounds which cause carbonyl stress and inhibiting AGE formation.

Therefore, the inventions set forth in Claims 1 and 2 do not involve an inventive step.

Claim 3

Document 3 discloses a KLH complex with bound chlorhexidine.

Therefore, the invention set forth in Claim 3 is not novel.

Claims 4 and 5

None of Documents 1-3 discloses an adsorbent for carbonyl compounds comprising a carrier with a biguanide immobilized thereon, or removal of carbonyl compounds by using such a carrier, and these features could not easily be deduced by a person skilled in the art.

Therefore, the inventions set forth in Claims 4 and 5 are novel and involve an inventive step.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06987

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
wo,00/10606,a1 [ex]	02 March 2000 (02.03.2000)	23 August 1999 (23.08.1999)	24 August 1998 (24.08.1998)

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>
---------------------------------------	--	--

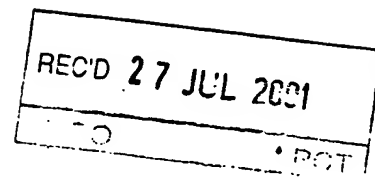
THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]



出願人又は代理人 の書類記号 KRK-106PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06987	国際出願日 (日.月.年) 06.10.00	優先日 (日.月.年) 06.10.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ A61K31/155, A61P43/00		
出願人 (氏名又は名称) 宮田 敏男		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>5</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input checked="" type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input checked="" type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 23.03.01	国際予備審査報告を作成した日 12.07.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 今 村 玲 英 子 印	4C 8517
電話番号 03-3581-1101 内線 3452		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USF10)

IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. ☒ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

この出願には、以下の2つの発明が含まれている。
請求項1－2：ビグアニド剤を有効成分とするカルボニルストレス改善剤に関する発明
請求項3－5：ビグアニド剤を固定化した担体、その用途、その使用方法に関する発明
請求項1－2の発明と請求項3－5の発明とは、ビグアニド剤のみを共通にしているが、ビグアニド剤は公知物であるから、上記2つの発明は先行技術を越える特別の技術的特徴を共有する関係にあるとは認められず、したがって単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとはいえない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 _____ に関する部分

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1, 2, 4, 5	有
	請求の範囲	3	無
進歩性 (IS)	請求の範囲	4, 5	有
	請求の範囲	1-3	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-5	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1: TANAKA YASUSHI et al. "INHIBITORY EFFECT OF METFORMIN ON FORMATION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS,"
CURRENT THERAPEUTIC RESEARCH, VOL. 58, NO.10(1997) pp.693-697

文献2: YASUDA YOSHINARI et al. "CARBONYL STRESS. A NEW DEVELOPMENT OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS,"
GENDAI IGAKU, VOL.45, NO.2(1997) pp.363-368

文献3: G.T.LAYTON et al. "FACTORS INFLUENCING THE IMMUNOGENICITY OF THE HAPTENIC DRUG CHLORHEXIDINE IN MICE-PART I. MOLECULAR REQUIREMENTS FOR THE INDUCTION OF IgE AND IgG ANTI-HAPTEN ANTIBODIES,"
MOLECULAR IMMUNOLOGY, VOL.24, NO.2 (1987) pp.133-141

<請求の範囲1, 2について>

文献1には、メトロホルミンが後期段階生成物 (advanced glycation end products, AGE) の生成を阻害することについて記載されており、グアニジン及びビグアニドがアミノ基の豊富な化合物であって、アミノグアニジンヒドロクロリド (AG) が、ジカルボニル代謝物と反応して後期段階生成物 (advanced glycation end products, AGE) の生成を阻害し、メイラード反応 (Maillard reaction) を抑えること (p.693の下から4行~p.694の2行) についても記載されている。

また、文献2には、カルボニル化合物がカルボニルストレスを生じさせることについて記載されている。

してみれば、カルボニルストレスを改善するために、カルボニルストレスの原因物質であるカルボニル化合物と反応してAGEの生成を阻害するビグアニドを用いてみることは、当業者が容易に想到することと認められる。

したがって、請求の範囲1, 2に記載の発明は、進歩性を有しない。

<請求の範囲3について>

文献3には、クロルヘキシジンを結合させたKLH複合体が記載されている。

したがって、請求の範囲3に記載の発明は、新規性を有しない。

<請求の範囲4, 5について>

ビグアニド剤を固定化した担体をカルボニル化合物の吸着剤とすること、かかる担体を用いてカルボニル化合物の除去をすることについては、文献1~3のいずれにも記載されていないし、文献1~3の記載を合わせてみても、当業者が容易に想到しえたものとは認められない。

したがって、請求の範囲4, 5に記載の発明は、新規性、進歩性を有する。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 00/10606, A1 [EX]	02. 03. 00	23. 08. 99	24. 08. 98

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔PCT 18 条、PCT 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 KRK-106PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/06987	国際出願日 (日.月.年) 06.10.00	優先日 (日.月.年) 06.10.99
出願人 (氏名又は名称) 宮田 敏男		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

この出願には、以下の2つの発明が含まれている。

請求項1-2：ビグアナイド剤を有効成分とするカルボニルストレス改善剤に関する発明

請求項3-5：ビグアナイド剤を固定化した担体、その用途、その使用方法に関する発明

請求項1-2の発明と請求項3-5の発明とは、ビグアナイド剤のみを共通にしているが、ビグアナイド剤は公知物であるから、上記2つの発明は先行技術を越える特別の技術的特徴を共有する関係にあるとは認められず、したがって単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとはいえない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61K31/155, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61K31/155, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	TANAKA YASUSHI et al. "INHIBITORY EFFECT OF METFORMIN ON FORMATION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS," CURRENT THERAPEUTIC RESEARCH, VOL. 58, NO. 10 (1997) pp. 693-697	1, 2
Y	YASUDA YOSHINARI et al. "CARBONYL STRESS. A NEW DEVELOPMENT OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS," GENDAI IGAKU, VOL. 45, NO. 2 (1997) pp. 363-368	1, 2
X	G. T. LAYTON et al. "FACTORS INFLUENCING THE IMMUNOGENICITY OF THE HAPTENIC DRUG CHLORHEXIDINE IN MICE-PART I. MOLECULAR	3

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
15. 12. 00

国際調査報告の発送日
26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
今村 玲 英 子
4C 8517
電話番号 03-3581-1101 内線 3452

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	REQUIREMENTS FOR THE INDUCTION OF IgE AND IgG ANTI-HAPTEN ANTIBODIES," MOLECULAR IMMUNOLOGY, VOL. 24, NO. 2 (1987) pp. 133-141	
P X	WO, 00/10606, A1 (MIYATA TOSHIO) 2. 3月. 2000 (02. 03. 00) (ファミリーなし)	1, 2
P X	DANIEL RUGGIERO-LOPEZ et al. "REACTION OF METFORMIN WITH DICARBONYL COMPOUNDS. POSSIBLE IMPLICATION IN THE INHIBITION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCT FORMATION," BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, VOL. 58, NO. 11(1999) pp. 1766-1773	1, 2
A	US, 4028402, A (Hoffmann-La Roche Inc.,) 7. 7月. 1977 (07. 07. 77) & DE, 2542598, A & FR, 2287221, A & GB, 1473256, A & JP, 52-83906, A	1-5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 4 月 12 日 (12.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/24790 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 31/155, A61P 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06987
- (22) 国際出願日: 2000 年 10 月 6 日 (06.10.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平 11/285735 1999 年 10 月 6 日 (06.10.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 黒川 清 (KUROKAWA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒162-0061 東京都新宿区市谷柳町 49 市ヶ谷ヒルズ 401 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 宮田敏男 (MIYATA, Toshio) [JP/JP]; 〒259-1132 神奈川県伊勢原市桜台 2 丁目 16-25 エクセル伊勢原 102 号 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: AGENTS FOR RELIEVING CARBONYL STRESS

(54) 発明の名称: カルボニルストレス改善剤

(57) Abstract: Agents for relieving carbonyl stress which comprise biguanides such as metoformin. By administering orally or the like, these agents are usable as drugs directly acting on carboxyl stress *in vivo*.

(57) 要約:

メトホルミン等のビグアナイド剤からなるカルボニルストレス改善剤が提供される。本発明のカルボニルストレス改善剤は、経口投与等により生体内のカルボニルストレスに直接的に作用する薬剤として利用することができる。

WO 01/24790 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 1 -

明細書

カルボニルストレス改善剤

技術分野

本発明は、カルボニルストレスの改善剤に関する。

背景技術

生体内において、カルボニル化合物の非酵素的生化学反応による生成が亢進した状態をカルボニルストレスと呼ぶ。カルボニル化合物は、メイラード反応を通じて老化、糖尿病、あるいは動脈硬化などの成人病との関連性が指摘されている。メイラード反応とは、グルコースなどの還元糖とアミノ酸やタンパク質との間に生じる非酵素的な糖化反応である。1912年にメイラード(Maillard)がアミノ酸と還元糖の混合物を加熱すると褐色に着色する現象に注目して報告した(Maillard, L. C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 599, 1912)。メイラード反応は、食品の加熱処理や貯蔵の間に生じる褐変、芳香成分の生成、呈味、タンパク質変性などに関与していることから、食品化学の分野で研究が進められてきた。

ところが、1968年ヘモグロビンの微小画分であるグリコシルヘモグロビン(Hb A1c)が生体内で同定され、さらにこれが糖尿病患者において増加することが判明し(Rahbar, S., Clin. Chim. Acta, 22: 296, 1968)、それを契機に生体内におけるメイラード反応の意義並びに糖尿病合併症、動脈硬化などの成人病の発症や老化の進行との関係が注目されるようになってきた。たとえば、アマドリ化合物以降の反応で生成するピラリンやペントシジンに代表される後期段階生成物(Advanced glycation end products、以下 AGE と省略する)は、老化や糖尿病の指標になりうると考えられている。実際に慢性腎不全の患者においては、高血糖の有無に関わらず血中や組織中に反応性の高いカルボニル化合物や AGE が著しく蓄積

- 2 -

している(Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 51:1170-1181, 1997、Miyata, T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 7:1198-1206, 1996、Miyata, T. et al., *Kidney Int.* 55:389-399, 1999、Miyata, T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:2349-2356, 1998)。これは腎不全においては、カルボニルストレスが存在しており、糖や脂質に由来するカルボニル化合物がアミノ基とメイラード反応を起こし、タンパク質を修飾するためであると考えられる(Miyata, T. et al., *Kidney Int.* 55:389-399, (1999))。

したがって、生体内において生成されるカルボニル化合物を除去することによってカルボニルストレス状態を改善することは、腎不全におけるAGEの生成を抑制し、組織障害の軽減につながると考えられる。

更に腹膜透析の場合、血中の老廃物は腹膜を通して腹膜透析液中に排泄される。高浸透圧の腹膜透析液（グルコース、イコデキストリンまたはアミノ酸等を含む）は、腎不全患者の血中に蓄積した反応性の高いカルボニル化合物を、腹膜を介して腹腔内の腹膜透析液中に集める作用がある。そのため腹膜透析液中のカルボニル化合物濃度は上昇し、カルボニルストレスの状態がもたらされる。その結果、腹腔内のタンパク質がカルボニル修飾を受けて腹膜の機能が低下し、除水能の低下や腹膜硬化症の進展に関与すると考えられる(Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 58:425-435, 2000、Inagi R., et al., *FEBS Lett.*, 463:260-264, 1999、Ueda, Y., et al., *Kidney Int.* (in press)、Combet, S., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11:717-728, 2000)。

実際に腹膜透析患者においては、導入されたグルコースによって腹腔内がカルボニルストレス状態となっていることは、内皮および中皮の免疫組織学的検討から証明された(Yamada, K. et al., *Clin. Nephrol.*, 42: 354-361, 1994、Nakayama, M. et al., *Kidney Int.*, 51: 182-186, 1997、Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 58:425-435, 2000、Inagi R., et al., *FEBS Lett.*, 463:260-264, 1999、Combet, S., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11:717-728, 2000)。このように、透析患者においてもカルボニルストレスが腹膜の形態学的変化およびこれに伴う

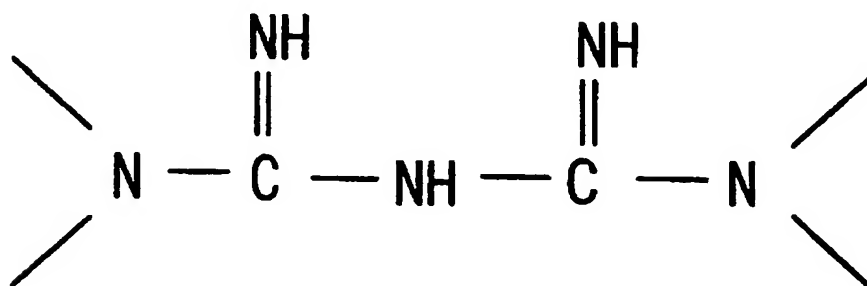
- 3 -

機能（除水能）の低下の原因となっていることが推測されており、その改善方法の提供が求められている。

腹膜透析患者におけるカルボニルストレスの改善方法として、本発明者はアミノグアニジン等のカルボニル化合物トラップ剤の利用について特許出願している（PCT/JP99/04521）。

ところで、グアニジン骨格を持つ化合物として、糖尿病治療薬、殺菌剤、あるいは抗マラリア薬に用いられているピグアナイド剤が公知である。ピグアナイド剤は式（１）に示す基本骨格を有し、反応性に富むイミノ基(=NH)が存在することから、アミノグアニジンと同様にカルボニル化合物の除去作用が期待される。しかし実際には両者の立体構造の相違から、ピグアナイド剤は糖化抑制効果を持たないとされている（「新糖尿病の薬物療法」pp22-31, 3. ピグアナイド剤；田中 逸、メディカル・コア発行（1997年））。

（１）



発明の開示

本発明は、全身的なカルボニルストレス状態に対しても効果を期待できるカルボニルストレス改善剤の提供を課題としている。

- 4 -

本発明者は、血液中などに蓄積されたカルボニル化合物の低減効果を有する化合物の探索を試みた。先に引用した先行技術にあるように、ビグアナイド剤には糖化の抑制作用が期待できないとされていた。しかし本発明者は、フェンホルミン、メトホルミン、あるいはブホルミンといったビグアナイド剤を用いることにより、媒体中のカルボニル化合物濃度を低減させることができることを明らかにし、本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のカルボニルストレス改善剤に関する。

〔１〕ビグアナイド剤または薬理学的に許容されるそれらの塩を有効成分とするカルボニルストレス改善剤。

〔２〕ビグアナイド剤が、フェンホルミン、メトホルミン、およびブホルミンから構成される群から選択された化合物、またはその薬理学的に許容しうる塩である〔１〕に記載のカルボニルストレス改善剤。

〔３〕ビグアナイド剤を固定化した担体。

〔４〕〔３〕に記載の担体で構成されるカルボニル化合物の吸着剤。

〔５〕〔３〕に記載の担体を患者血液、または腹膜透析液と接触させる工程を含むカルボニル化合物の除去方法。

あるいは本発明は、ビグアナイド剤または薬理学的に許容されるそれらの塩の、カルボニルストレス改善剤の製造における使用に関する。また本発明は、ビグアナイド剤を固定化した担体の、カルボニル化合物の吸着剤の製造における使用に関する。

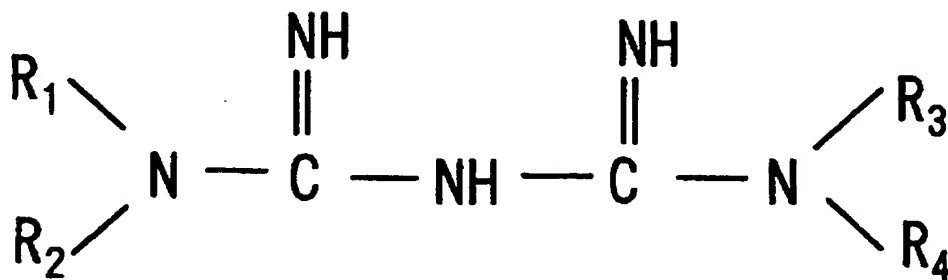
ビグアナイド剤は、糖尿病の治療薬として用いられているグアニジン骨格を持つ一群の化合物である。経口血糖降下剤として古くから用いられているスルホニル尿素 (Sulfonyl Urea; SU 剤) 剤に代わって、広く用いられるようになっていく。インスリン分泌促進作用は持たず、解糖促進作用を持ち、生体に対して血糖値の低下効果をもたらすことが知られている。しかしながら、カルボニル化合物

- 5 -

との相互作用については何ら報告されておらず、本発明の知見は新規なものである。

本発明におけるピグアナイド剤とは、たとえば次の一般式（１）で示される構造を持つ化合物を意味する。式中、R₁、R₂、R₃、およびR₄は、H、フェニル基またはアルキル基である。アルキル基としては、フェネチル基、メチル基、あるいはブチル基等を示すことができる。

一般式（１）



上記構造を持つ化合物であって、カルボニルストレスをもたらすカルボニル化合物に作用し、そのタンパク質修飾作用を阻害する化合物が本発明において利用される。

一方本発明において、カルボニルストレスの原因となるカルボニル化合物とは、例えば腎不全患者の血中に酸化ストレスにともなって蓄積する以下のような化合物が含まれる。

炭水化物に由来するカルボニル化合物：

- ・アラビノース
- ・グリオキサル
- ・メチルグリオキサル

- 6 -

・ 3-デオキシグルコゾン

アスコルビン酸に由来するカルボニル化合物：

・ デヒドロアスコルビン酸

脂質に由来するカルボニル化合物：

・ ヒドロキシノネナール

・ マロンジアルデヒド

・ アクロレイン

また、腹膜透析液の滅菌や保存中に、たとえば以下のようなカルボニル化合物が腹膜透析液中に生成することが知られている(Richard, J. U. et al., Fund. Appl. Toxic., 4: 843-853 (1984))。これらのカルボニル化合物も、透析を通じて患者にカルボニルストレスの状態をもたらしていることが指摘されている。

・ 3-デオキシグルコゾン

・ 5-ヒドロキシメチルフルフラール (5-hydroxymethylfurfural)

・ ホルムアルデヒド

・ アセトアルデヒド

・ グリオキサール

・ メチルグリオキサール

・ レブリン酸

・ フルフラール

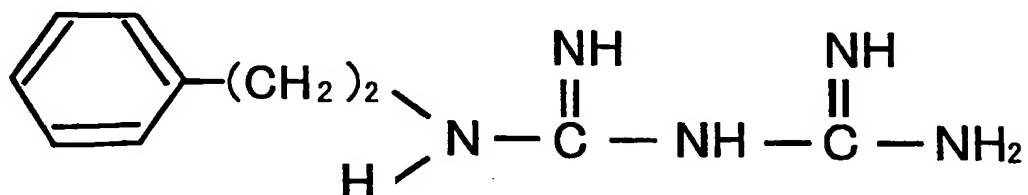
・ アラビノース

本発明によるカルボニルストレスの改善剤は、ビグアナイド剤を有効成分として含有する。本発明においてカルボニルストレスの改善とは、生体に接触する媒体中のカルボニル化合物の反応性を奪い、タンパク質の修飾作用を低減する作用を言う。具体的には、例えばカルボニル化合物の吸着や分解、あるいはアミノ基との反応性の低下などの作用が期待できるとき、カルボニルストレスの改善作用があると言える。生体に接触する媒体とは、具体的には腹膜透析液や

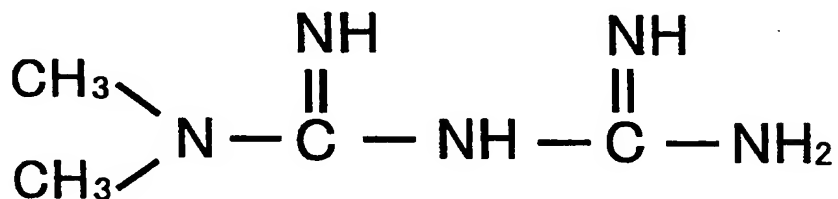
- 7 -

血液他の体液を言う。本発明に利用することができるビグアナイド剤として、以下の化合物を示すことができる。これらの化合物は、薬理学的に許容しうる塩であつてもよい。

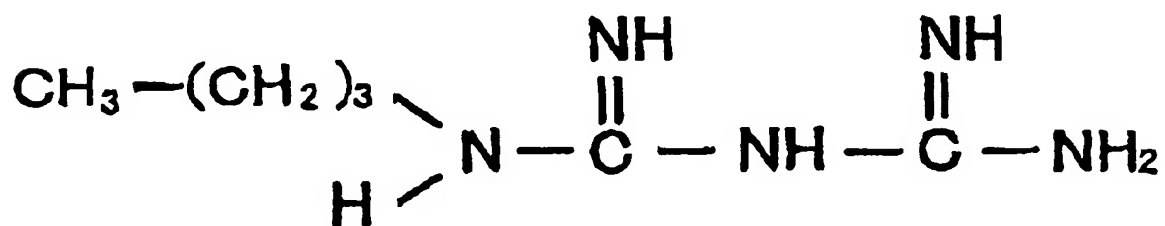
フェンホルミン(Phenformin; Phenethyl biguanide)



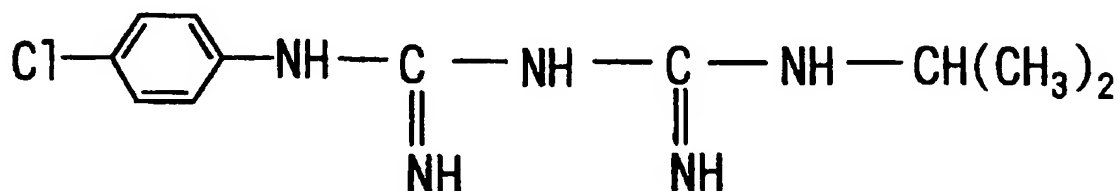
メトホルミン(Metformin; Dimethyl biguanide)



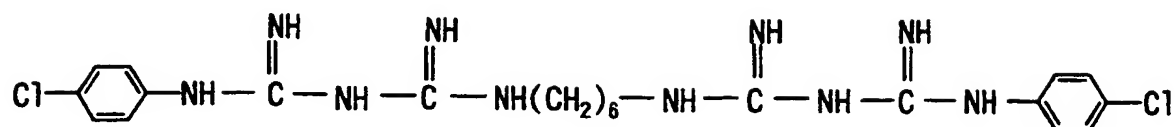
ブホルミン(Buformin; Buthyl biguanide)



プログアニル(Proguanil)



クロルヘキシジン(Chlorhexidine)



本発明によるカルボニルストレスの改善剤には、例えば以下のような化合物又はそれらの誘導体であって、カルボニル化合物トラップ剤として機能する化合物を組み合わせることができる。なお誘導体とは、化合物のいずれかの位置で原子または分子の置換が起きている化合物を指す。

(1)メチルグアニジンなどのグアニジン誘導体 (特開昭62-142114号、特開昭62-249908号、特開平1-56614号、特開平1-83059号、特開平2-156号、特開平2-765号、特開平2-42053号、特開平6-9380号、特表平5-505189号)。

(2)スルホニルヒドラジンなどのヒドラジン誘導体。

(3)ピラゾロン (特開平6-287179号)、ピラゾリン (特開平10-167965号)、ピラゾール (特開平6-192089号、特開平6-298737号、特開平6-298738号)、イミダゾリジン (特開平5-201993号、特開平6-135968号、特開平7-133264号、特開平10-182460号)、ヒダントイン (特開平6-135968号) などの2個の窒素原子を有する5員複素環式化合物。

(4)トリアゾール (特開平6-192089号) などの3個の窒素原子を有する5員複素環式化合物。

(5)チアゾリン (特開平10-167965号)、チアゾール (特開平4-9375号、特開平9-59258号)、チアゾリジン (特開平5-201993号、特開平3-261772号、特開平7-133264号、特開平8-157473号) などの1個の窒素原子と1個の硫黄原子を有する5員複素環式化合物。

- 9 -

- (6)オキサゾール（特開平9-59258号）などの1個の窒素原子と1個の酸素原子を有する5員複素環式化合物。
- (7)ピリジン（特開平10-158244号、特開平10-175954号）、ピリミジン（特表平7-500811号）などの含窒素6員複素環式化合物。
- (8)インダゾール（特開平6-287180号）、ベンゾイミダゾール（特開平6-305964号）、キノリン（特開平3-161441号）などの含窒素縮合複素環式化合物。
- (9)ベンゾチアゾール（特開平6-305964号）などの含硫含窒素縮合複素環式化合物。
- (10)ベンゾチオフェン（特開平7-196498号）などの含硫縮合複素環式化合物。
- (11)ベンゾピラン（特開平3-204874号、特開平4-308586号）などの含酸素縮合複素環式化合物。
- (12)カルバゾイル（特開平2-156号、特開平2-753号）、カルバジン酸（特開平2-167264号）、ヒドラジン（特開平3-148220号）などの窒素化合物。
- (13)ベンゾキノン（特開平9-315960号）、ヒドロキノン（特開平5-9114号）などのキノン類。
- (14)脂肪族ジカルボン酸（特開平1-56614号、特開平5-310565号）。
- (15)ケイ素含有化合物（特開昭62-249709号）。
- (16)有機ゲルマニウム化合物（特開平2-62885号、特開平5-255130号、特開平7-247296号、特開平8-59485号）。
- (17)フラボノイド類（特開平3-240725号、特開平7-206838号、特開平9-241165号、WO94/04520）。

- 10 -

- (18)アルキルアミン類 (特開平6-206818号、特開平9-59233号、特開平9-40626号、特開平9-124471号)。
- (19)アミノ酸類 (特表平4-502611号、特表平7-503713号)。
- (20)アスコクロリン (特開平6-305959号)、安息香酸 (WO91/11997)、ピロロナフチリジニウム (特開平10-158265号) などの芳香族化合物。
- (21)ポリペプチド (特表平7-500580号)。
- (22)ピリドキサミンなどのビタミン類 (WO97/09981)。
- (23)グルタチオン、システイン、N-アセチルシステインなどのSH基含有化合物。
- (24)還元型アルブミンなどのSH基含有蛋白。
- (25)テトラサイクリン系化合物 (特開平6-256280号)。
- (26)キトサン類 (特開平9-221427号)。
- (27)タンニン類 (特開平9-40519号)。
- (28)第4級アンモニウムイオン含有化合物。
- (29)イオン交換樹脂。
- (30)活性炭、シリカゲル、アルミナ、炭酸カルシウムなどの無機化合物。

本発明のカルボニルストレス改善剤は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合し、医薬組成物として経口、あるいは非経口的に投与することができる。経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型とすることができる。非経口剤としては、注射剤、点滴剤、外用薬剤、あるいは座剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、静脈注射剤、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。外用薬剤には、経鼻投与剤、貼付剤、あるいは軟膏剤等を示すことができる。主成分であるピグアナイド剤をこのような剤型とする製剤技術は公知である。

- 1 1 -

たとえば経口投与用の錠剤は、ビグアナイド剤に賦形剤、崩壊剤、結合剤、および滑沢剤等を加えて混合し、圧縮成型することにより製造することができる。賦形剤には、乳糖、デンプン、あるいはマンニトール等が一般に用いられる。崩壊剤としては、炭酸カルシウムやカルボキシメチルセルロースカルシウム等が一般に用いられる。結合剤には、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、あるいはポリビニルピロリドンが用いられる。滑沢剤としては、タルクやステアリン酸マグネシウム等が公知である。

本発明によるカルボニルストレスの改善剤を含む錠剤は、マスキングや、腸溶性製剤とするために、公知のコーティングを施すことができる。コーティング剤には、エチルセルロースやポリオキシエチレングリコール等を用いることができる。

また注射剤は、主成分であるビグアナイド剤を適当な分散剤とともに溶解、分散媒に溶解、あるいは分散させることにより得ることができる。分散媒の選択により、水性溶剤と油性溶剤のいずれの剤型とすることもできる。水性溶剤とするには、蒸留水、生理食塩水、あるいはリンゲル液等を分散媒とする。油性溶剤では、各種植物油やプロピレングリコール等を分散媒に利用する。このとき、必要に応じてパラベン等の保存剤を添加することもできる。また注射剤中には、塩化ナトリウムやブドウ糖等の公知の等張化剤、塩酸や水酸化ナトリウム等の pH 調整剤を加えることができる。更に、塩化ベンザルコニウムや塩酸プロカインのような無痛化剤を添加することができる。

本発明によるカルボニルストレス改善剤は、ビグアナイド剤を固形、液状、あるいは半固形状の組成物とすることにより外用剤とすることができる。固形、あるいは液状の組成物については、先に述べたものと同様の組成物とすることで外用剤とすることができる。半固形状の組成物は、適当な溶剤に必要な応じて増粘剤を加えて調製することができる。溶剤には、水、エチルアルコール、あるいはポリエチレングリコール等を用いることができる。増粘剤には、一般にベントナ

- 12 -

イト、ポリビニルアルコール、アクリル酸、メタクリル酸、あるいはポリビニルピロリドン等が用いられる。この組成物には、塩化ベンザルコニウム等の保存剤を加えることができる。また、担体としてカカオ脂のような油性基材、あるいはセルロース誘導体のような水性ゲル基材を組み合わせることにより、座剤とすることもできる。

本発明のカルボニルストレス改善剤の主成分となるピグアナイド剤は、既に医薬品として利用されている化合物である。したがって、通常安全とされている投与量の範囲内において、ヒトを含む哺乳動物に対して、必要量が投与される。投与量は、投与方法（剤型）や投与対象の状態（体格、年齢、性別、症状）に応じて適宜選択される。一般的には、経口投与で通常成人1日用量として体重1kg当たり0.001～10mg、より望ましくは0.01～1mgとすることにより、カルボニルストレスの改善効果を得ることができる。また投与回数は、たとえば1日1～5回の範囲で適宜選択することができる。なお本発明において、ピグアナイド剤をカルボニルストレスの改善を目的として投与する場合、明らかな毒性は認められない。

本発明のカルボニルストレス改善剤の生体への投与方法として、腹膜透析液への添加を挙げることができる。腹膜透析は腹腔への透析液の注入によって行われるので、このとき腹膜透析液中に予め本発明のカルボニルストレス改善剤を添加しておけば良いのである。腹膜透析液中に浸出するカルボニル化合物がピグアナイド剤と反応して無害化され、結果的にカルボニルストレス状態が改善される。また、予め透析液中に添加されたピグアナイド剤は、透析液の高圧蒸気滅菌等の処理等に伴って製造段階や保存中に生成するカルボニル化合物を予防的に無害化する作用も期待できる。本発明に基づいて腹膜透析液にピグアナイド剤を添加する場合には、たとえば0.5～100mM、通常1～50mM、好ましくは5～20mMとなるように添加する。

- 13 -

本発明におけるカルボニルストレスの改善剤は、生体への投与の他、生体外における血液や透析液等との接触を通じてカルボニルストレスを改善する方法に適用することもできる。このような利用形態においては、ヒグアナイド剤を担体に固定化して用いるのが有利である。

本発明におけるヒグアナイド剤を固定化する担体としては、人体に対して無害なもの、血液や透析液に直接接触する材料として安全性および安定性を有するものであれば特に制限はなく、例えば、合成または天然の有機高分子化合物や、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭などの無機材料、およびこれらの表面に多糖類、合成高分子などをコーティングしたものなどが挙げられる。

高分子化合物からなる担体としては、例えば、ポリメチルメタクリレート系重合体、ポリアクリロニトリル系重合体、ポリスルホン系重合体、ビニル系重合体、ポリオレフィン系重合体、フッ素系ポリマー系重合体、ポリエステル系重合体、ポリアミド系重合体、ポリイミド系重合体、ポリウレタン系重合体、ポリアクリル系重合体、ポリスチレン系重合体、ポリケトン系重合体、シリコン系重合体、セルロース系重合体、キトサン系重合体などがあげられる。具体的には、アガロース、セルロース、キチン、キトサン、セファロース、デキストラン等の多糖類およびそれらの誘導体、ポリエステル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリプロピレン、ポリビニルアルコール、ポリアリルエーテルスルホン、ポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル酸エステル、ポリカーボネート、アセチル化セルロース、ポリアクリロニトリル、ポリエチレンテレフタレート、ポリアミド、シリコン樹脂、フッ素樹脂、ポリウレタン、ポリエーテルウレタン、ポリアクリルアミド、それらの誘導体などが挙げられる。これらの高分子材料は単独、あるいは2種以上を組み合わせで使用され得る。2種以上組み合わせる場合は、そのうち少なくとも1種にヒグアナイド剤が固定化される。固定化されるヒグアナイド剤は、単独で固定化するほか、2種類以上を固定化してもよい。

- 14 -

担体の形状に制限はなく、例えば膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状などがあげられる。これらの担体は、厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、および／または大きさを種々変えることにより、血液や透析液との接触面積を制御することができる。

上記担体にビグアニド剤を固定化するには、公知の方法、例えば、物理的吸着法、生化学的特異結合法、イオン結合法、共有結合法、グラフト化などを用いればよい。また必要によりスペーサーを担体とビグアニド剤の間に導入してもよい。両者を共有結合によって結合すれば、ビグアニド剤の溶出量をできるだけ少なくすることができるので好ましい。ビグアニド剤を担体に共有結合するには、担体に存在する官能基を用いればよい。官能基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシ基、チオール基、ヒドロキシ基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、サクシニルイミド基等が挙げられるが、これらに制限されない。共有結合の例としてエステル結合、エーテル結合、アミノ結合、アミド結合、スルフィド結合、イミノ結合、ジスルフィド結合等が挙げられる。

本発明のビグアニド剤を固定化した担体は、公知の方法によって滅菌することができる。具体的には高圧蒸気滅菌、ガンマ線照射滅菌、ガス滅菌などが挙げられる。

ビグアニド剤を固定化した担体と血液との接触には、種々の形態が考えられる。例えば、ビグアニド剤を固定化した担体が充填された血液バッグに採血した患者の血液を入れ、この中で患者血液のカルボニル化合物をトラップする方法、ビグアニド剤を固定化したビーズ状、または繊維状等の担体をカラムに充填してカートリッジとし、これに血液を循環させる方法、などが挙げられる。血液は、全血でなくても、血漿を分離したのち、血漿を処理してもよい。処理された血液は患者に戻されるか、必要に応じて血液バッグ中などに保存することもできる。

血液バッグ内にヒグアナイド剤を固定化した担体を含めておくことにより、保存中に生成・蓄積するカルボニル化合物をトラップすることも可能である。

本発明のヒグアナイド剤を固定化した担体と血液との接触は、血液透析や血液濾過、血液濾過透析、血液吸着、血漿分離を含む血液浄化の過程で行うことができる。

例えば、血液透析患者に対しては、血液透析回路内にヒグアナイド剤を固定化した担体を配置させることにより、血液透析とカルボニル化合物のトラップとを同時に行うことができる。この場合、ヒグアナイド剤を血液透析膜に固定化しておくことが好ましい。担体として用いられる透析膜の種類は公知のものを使用することができる。例えば、再生セルロース、セルローストリアセテート等のセルロース誘導体、ポリメチルメタクリレート、ポリオレフィン、ポリスルホン、ポリアクリロニトリル (PAN)、ポリアミド、ポリイミド、ポリエーテルナイロン、シリコン、ポリエステル系共重合体等が挙げられ、特に限定されない。もちろん透析膜を担体とせず、上記のように、ヒグアナイド剤を固定化した担体を充填したカラムを血液透析回路中に配置させてもよい。このように患者血液をヒグアナイド剤を固定化した担体に接触させることにより、血中由来のカルボニル化合物が捕捉され、その生体に対する障害活性がうばわれ、無害化される。体外循環時に血液の凝固を防ぐため、抗凝固剤を併用することもできる。抗凝固剤としては、例えば、ヘパリン、低分子ヘパリン、フサン（メシル酸ナファモスタット）等が挙げられる。これらは、担体に固定化されていてもよい。

血液との接触の他、腹膜透析液を固定化したヒグアナイド剤と接触させる方法も、カルボニルストレス状態の改善においては有効である。たとえば腹膜透析においては、ヒグアナイド剤を内部に固定化した容器、あるいは粒子や繊維のような担体に固定したヒグアナイド剤入りの容器に腹膜透析液を収容し、保存中に生成・蓄積するカルボニル化合物をトラップさせることができる。後者においては、不溶性担体をろ過などによって腹膜透析液から分離することができる。またヒグ

- 16 -

アナイド剤を固定化したビーズ状、または繊維状等の担体をカラムに充填してカルボニル化合物トラップ用カートリッジとし、このカートリッジに腹膜透析液を接触させた後に腹腔内に導入することもできる。腹腔導入時にカルボニル化合物トラップ用カートリッジに接触させる場合、透析中に蓄積する患者由来のカルボニル化合物を除去することはできないが、透析液中のカルボニル化合物の除去は可能である。あるいは腹膜透析液を小型の循環ポンプを使用して閉鎖系回路内で循環させるような腹膜透析法の場合にあっては、循環回路中にビグアナイド剤を固定化した前記カルボニル化合物トラップ用カートリッジを設置することにより、腹膜透析液のみならず、透析中に腹腔内に蓄積するカルボニル化合物の除去をも達成することができる。

血液や透析液との接触時に用いるビグアナイド剤が少ないと、透析時に患者血中の一部のカルボニル化合物を処理することができなくなるケースが予想される。特に患者血中のカルボニル化合物の量をあらかじめ予測することは困難なので、患者に対する安全性を保障できる範囲内でできるだけ多量のビグアナイド剤が活性を維持できるようにするのが効果的である。ビグアナイド剤の用量は、担体へのビグアナイド剤の固定化量、またはビグアナイド剤が固定化された担体の使用量を変更して調整することができる。

本発明のカルボニルストレス改善剤の効果は、血中のカルボニル化合物濃度や AGE 濃度を追跡することにより確認することができる。生体内における効果を見るには、本発明によるカルボニルストレス改善剤を投与した群と、対照の間で、血中の AGE 濃度を比較する。対照には、無処理群、あるいはこの改善剤から主剤であるビグアナイド剤のみを除いた対照薬剤や生理食塩水を投与した群を置くと良い。カルボニル化合物としては、グリオキサール(GO)、メチルグリオキサール(MGO)、および 3-デオキシグルコソン(3DG)等を指標とすることができる。これらのカルボニル化合物は、実施例に示すように HPLC 等を用いて容易に測定することができる (Ohmori S. et al. J.Chromatogr.414:149-155,1987. Yamada H.,

- 17 -

J. Biol. Chem. 269:20275-20280, 1994)。あるいは、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(2,4-DNPH)を酸性下でカルボニル化合物と反応させ、生成する発色生成物を 360nm における吸光度で測定することもできる。また AGE としては、ペントシジン等を指標として利用することができる。ペントシジンの逆相 HPLC による定量方法は公知である(Miyata T, et al. J Am Soc Nephrol 7: 1198-1206, 1996)。

ヒグアナイド剤は、経口的に投与した場合、一般に投与後 1～2 時間において最大血中濃度を維持する(N. Engl. J. Med. 334:574-579, 1996)。したがって、この間のペントシジン濃度の推移を観察することにより、改善剤の効果を確認できる。対照に対するペントシジン濃度の低下によって、改善剤の効果を確認することができる。他方、生体外における本発明のカルボニルストレス改善剤の作用を確認するには、血液や透析液中におけるカルボニル化合物や AGE の濃度を確認すれば良い。

図面の簡単な説明

図 1 は、ヒグアナイド剤（メトホルミン）のカルボニル化合物に対するトラップ効果を示すグラフ。縦軸は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したカルボニル化合物の濃度(μM)、横軸はインキュベート時間（時間）を表す。

図 2 は、ヒグアナイド剤（ブホルミン）のカルボニル化合物に対するトラップ効果を示すグラフ。縦軸は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したカルボニル化合物の濃度(μM)、横軸はインキュベート時間（時間）を表す。

図 3 は、ヒグアナイド剤（フェンホルミン）のカルボニル化合物に対するトラップ効果を示すグラフ。縦軸は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したカルボニル化合物の濃度(μM)、横軸はインキュベート時間（時間）を表す。

図 4 は、ヒグアナイド剤を加えない場合（対照）のカルボニル化合物の濃度変化を示すグラフ。縦軸は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したカルボニル化合物の濃度(μM)、横軸はインキュベート時間（時間）を表す。

図5は、ビグアナイド剤による腹膜透析液中のジカルボニル化合物（グリオキサール）のトラップ作用を示すグラフ。縦軸は腹膜透析液中のグリオキサールの残存率（％）を、横軸はビグアナイド剤の種類を示す。

図6は、ビグアナイド剤による腹膜透析液中のジカルボニル化合物（メチルグリオキサール）のトラップ作用を示すグラフ。縦軸は腹膜透析中のメチルグリオキサールの残存率（％）を、横軸はビグアナイド剤の種類を示す。

図7は、ビグアナイド剤による腹膜透析液中のジカルボニル化合物（3-デオキシグルコソン）のトラップ作用を示すグラフ。縦軸は腹膜透析中の3-デオキシグルコソンの残存率（％）を、横軸はビグアナイド剤の種類を示す。

図8は、ビグアナイド剤による腹膜透析排液中のジカルボニル化合物（グリオキサールおよびメチルグリオキサール）のトラップ作用を示すグラフ。縦軸は腹膜透析排液中のグリオキサールおよびメチルグリオキサールの残存率（％）を、横軸はビグアナイド剤の種類およびその濃度を示す。

図9は、ビグアナイド剤による血清中のジカルボニル化合物（グリオキサールおよびメチルグリオキサール）のトラップ作用を示すグラフ。縦軸は血清中のグリオキサールおよびメチルグリオキサールの残存率（％）を、横軸はビグアナイド剤の種類およびその濃度を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

〔実施例1〕 ビグアナイド剤のカルボニル化合物トラップ効果

代表的なカルボニル化合物である、グリオキサール(GO)、メチルグリオキサール(MGO)、および3-デオキシグルコソン(3DG)の混合溶液(各1 mM)100 μ l、0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.4)800 μ l、30mMのビグアナイド剤溶液100 μ lを混合し、37°Cでインキュベートした。ビグアナイド剤としては、メトホルミン、ブホルミン、およびフェンホルミンを用いた。インキュベート終了後、溶液中のグリオキ

サール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンの濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。すなわち、インキュベート終了後のサンプル 100 μ l に 2M 過塩素酸 40 μ l、1% o-フェニレンジアミン 40 μ l、50 μ M 2,3-ブタンジオン 100 μ l を加えて攪拌後、25°C で 1 時間反応させた。ジカルボニル化合物と o-フェニレンジアミンとの反応で生成するキノキサリン誘導体を逆相カラムを用いた HPLC により Ohmori らの方法(Ohmori S. et al. J.Chromatogr.414:149-155,1987.)により測定した。標準品としてグリオキサール、メチルグリオキサール、および 3-デオキシグルコソンを用いた。

結果を図 1 (メトホルミン)、図 2 (ブホルミン)、および図 3 (フェンホルミン) に示した。カルボニル化合物のみではインキュベーション時間の間に測定値の変動はほとんど観察されない(図 4; control)。一方、ビグアナイド剤を加えた場合には、いずれの化合物においてもインキュベーション時間に応じてグリオキサールとメチルグリオキサールの濃度が顕著に低下し、ビグアナイド剤によるカルボニル化合物のトラップ効果を確認することができた。すなわち、ビグアナイド剤がカルボニル化合物と反応してその反応性を失うことが確認された。

【実施例 2】 ビグアナイド剤による腹膜透析液中のジカルボニルのトラップ作用
腹膜透析液中には高圧蒸気滅菌や保存中に生成したカルボニル化合物が存在している。従って、予め腹膜透析液中にビグアナイド剤を添加することによって、製造段階や保存中に生成するカルボニル化合物を予防的に無害化できる。あるいは、腹膜透析液をビグアナイド剤が固定化された担体と接触させることによって、当該カルボニル化合物を除去できる。

まず、市販の腹膜透析液(バクスター株式会社製、ダイアニール -登録商標- PD-4 1.5)中に存在する各種カルボニル化合物の量を Ohmori らの方法(Ohmori S. et al., J. Chromatogr., 414:149-155, 1987)を用いて測定した。

- 20 -

その結果、腹膜透析液中のグリオキサール濃度は $11 \mu\text{M}$ 、メチルグリオキサール濃度は $3.5 \mu\text{M}$ 、3-デオキシグルコソン濃度は $42 \mu\text{M}$ であった。

次に、この腹膜透析液（バクスター株式会社製、ダイアニール -登録商標- PD-4 1.5） $900 \mu\text{L}$ に、ヒグアナイド剤を 0.1M リン酸緩衝液（ $\text{pH } 7.4$ ）に溶解した溶液 $100 \mu\text{l}$ を添加してサンプル溶液とした。ヒグアナイド剤は、終濃度が 0 、 1 、 5 、 10mM となるように加えた。ヒグアナイド剤としては、メトホルミン、プロホルミン、およびフェンホルミンを用いた。混合後のサンプル溶液を 37°C で 4 時間インキュベートした。

インキュベート終了後、サンプル溶液に残存するグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンを、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて測定した。すなわち、インキュベート終了後のサンプル $100 \mu\text{l}$ に 2M 過塩素酸 $40 \mu\text{l}$ 、 1% *o*-フェニレンジアミン $40 \mu\text{l}$ 、 $25 \mu\text{M}$ 2,3-ブタンジオン $100 \mu\text{l}$ を加えて攪拌後、 25°C で 1 時間反応させた。ジカルボニル化合物と *o*-フェニレンジアミンとの反応で生成するキノキサリン誘導体を、逆相カラムを用いた HPLC により Ohmori らの方法（Ohmori S. et al. J. Chromatogr. 414:149-155, 1987）により測定した。標準品としてグリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンを用いた。

結果を図5（グリオキサール）、図6（メチルグリオキサール）、図7（3-デオキシグルコソン）に示した。各カルボニル化合物の量は、ヒグアナイド剤の存在しない場合を 100% としたときの残存率（%）で表される。ヒグアナイド剤の存在下では、ヒグアナイド剤の濃度に依存してグリオキサール、メチルグリオキサールの濃度が低下し、腹膜透析液においてもジカルボニル化合物のトラップ効果を確認することができた。

〔実施例3〕 ヒグアナイド剤による腹膜透析液排液中のジカルボニルのトラップ作用

- 21 -

腹膜透析においては、反応性の高いカルボニル化合物が、血中老廃物とともに、腹膜を介して患者腹腔中の腹膜透析液に蓄積されている。そこで、ヒグアナイド剤による、腹膜透析施行時における腹腔中の腹膜透析液中のカルボニル化合物のトラップ作用を検討する目的で、腹膜透析患者の腹腔中から排出された腹膜透析排液中のジカルボニル化合物に対するヒグアナイド剤のトラップ効果を実験した。

まず、市販の腹膜透析液（バクスター株式会社製、ダイアニール -登録商標- PD-4 1.5）を投与されている腹膜透析患者の腹膜透析排液（腹腔内に2時間貯留した液）900 μ l、ヒグアナイド剤を0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)に溶かした液100 μ lを添加し、混合後のヒグアナイドの濃度が0、5、25、50 mMの溶液となるようにし、37°Cで4時間インキュベートした。ヒグアナイド剤としては、メトホルミン、ブホルミン、およびフェンホルミンを用いた。インキュベート終了後のサンプル200 μ lに水200 μ l、2M過塩素酸100 μ lを加え遠心後、0.45 μ mのフィルターで濾過した。濾液150 μ lに10 μ M 2,3-ブタンジオン50 μ l、1% 0-フェニレンジアミン20 μ lを加えて攪拌後、室温で2時間反応させた。つぎに、5N水酸化ナトリウム水溶液40 μ lを加えて攪拌後トルエン600 μ l加えて抽出した。さらに、トルエン相500 μ lに2M過塩素酸を加え、攪拌しキノキサリン誘導体を抽出した。Ohmoriらの方法(Ohmori S. et al. J. Chromatogr. 414 :149-155, 1987)により水相を逆相カラムを用いたHPLCにより分析し、グリオキサール、メチルグリオキサールの定量を行った。標準品としてグリオキサール、メチルグリオキサールを用いた。

結果を図8に示した。各カルボニル化合物の量はヒグアナイド剤が存在しない場合を100%としたときの残存率(%)で表される。ヒグアナイド剤の存在下では、ヒグアナイド剤の濃度に依存してグリオキサール、メチルグリオキサールの濃度が低下し、腹膜透析液排液においてもジカルボニル化合物のトラップ効果を確認することができた。

- 22 -

〔実施例4〕 ビグアナイド剤による血清中のジカルボニルのトラップ作用

本発明のカルボニルストレス改善剤を血液透析施行患者に適用した場合の効果を確認する目的で、ビグアナイド剤による血清中のジカルボニル化合物のトラップ作用を実験した。

まず、血液透析を受けている患者の血清 900 μ l、ビグアナイド剤を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶かした液 100 μ l を添加し、混合後のビグアナイドの濃度が 0、5、25、50 mM の溶液となるようにし、37℃で4時間インキュベートした。ビグアナイド剤としては、メトホルミン、ブホルミン、およびフェンホルミンを用いた。グリオキサール、メチルグリオキサールの定量については、実施例3の場合と同様の方法で行った。

結果を図9に示した。各カルボニル化合物の量はビグアナイド剤が存在しない場合を100%としたときの残存率(%)で表される。ビグアナイド剤の存在下では、グリオキサール、メチルグリオキサールの濃度が低下し、血清中においてもジカルボニル化合物のトラップ効果を確認することができた。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、生体外のみならず、生体内でのカルボニル化合物除去作用を期待できるカルボニルストレス改善剤を提供することができる。本発明のカルボニルストレス改善剤を構成するビグアナイド剤は、既に経口血糖降下剤として臨床応用されている薬剤である。したがって、経口投与などの形で投与することができ、生体内のカルボニルストレスに対して直接的に作用する薬剤として利用することができる。また既に高度な製剤技術が確立されており、容易に供給することができる。

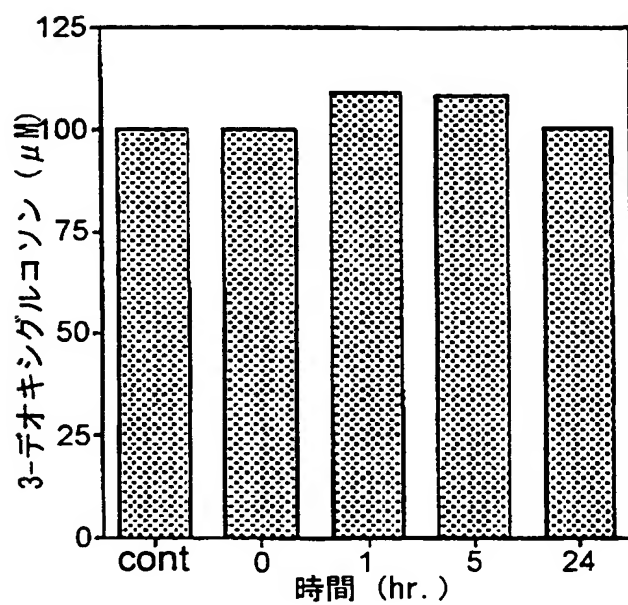
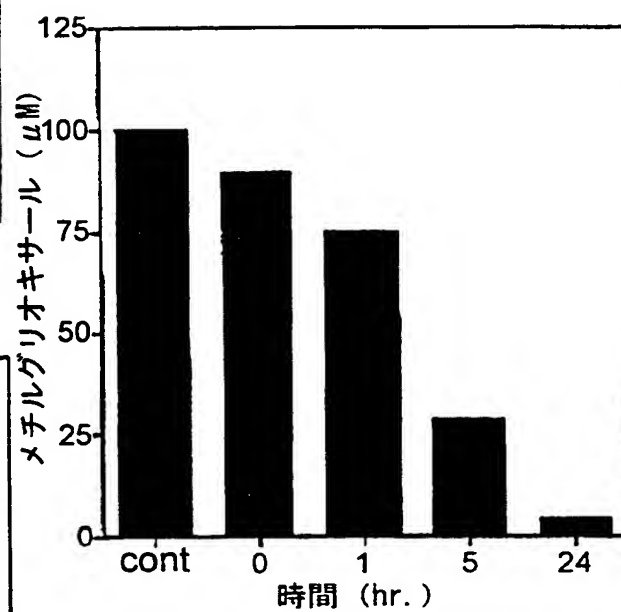
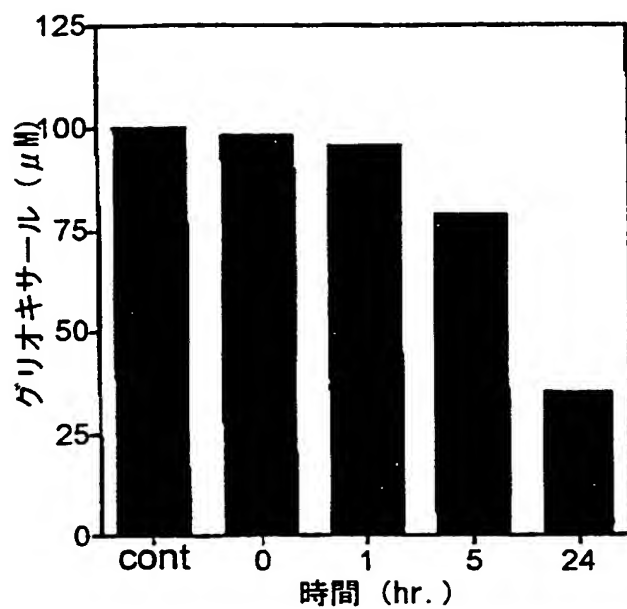
- 23 -

請求の範囲

1. ビグアニド剤または薬理学的に許容されるそれらの塩を有効成分とするカルボニルストレス改善剤。
2. ビグアニド剤が、フェンホルミン、メトホルミン、およびブホルミンから構成される群から選択された化合物、またはその薬理学的に許容しうる塩である請求項 1 に記載のカルボニルストレス改善剤。
3. ビグアニド剤を固定化した担体。
4. 請求項 3 に記載の担体で構成されるカルボニル化合物の吸着剤。
5. 請求項 3 に記載の担体を患者血液、または腹膜透析液と接触させる工程を含むカルボニル化合物の除去方法。

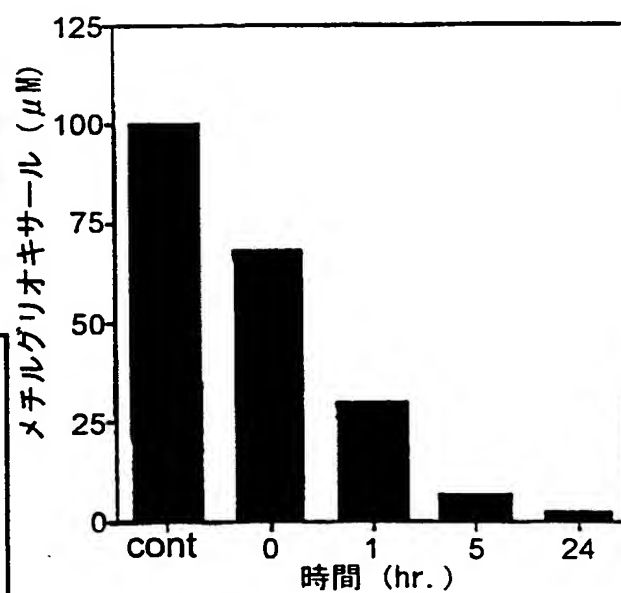
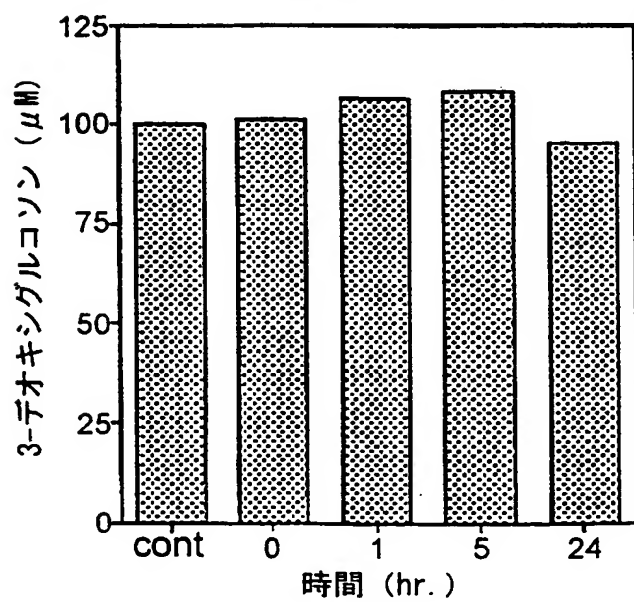
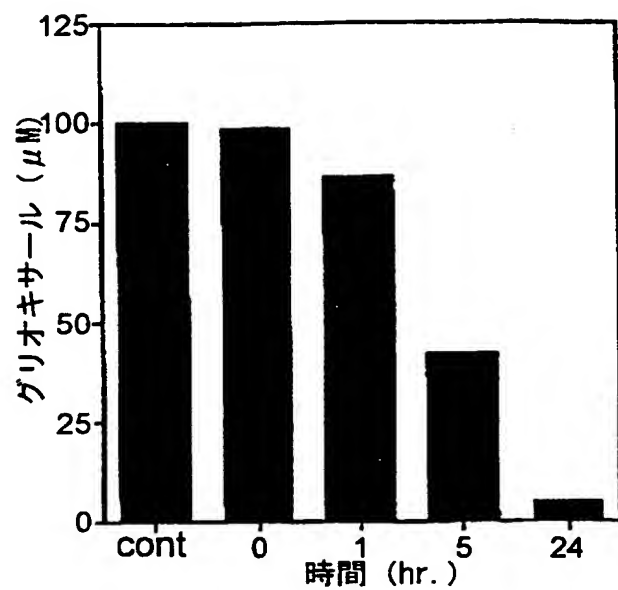
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

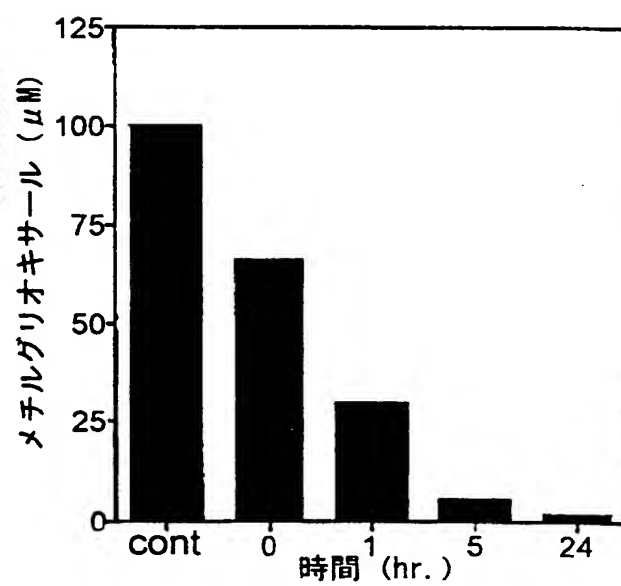
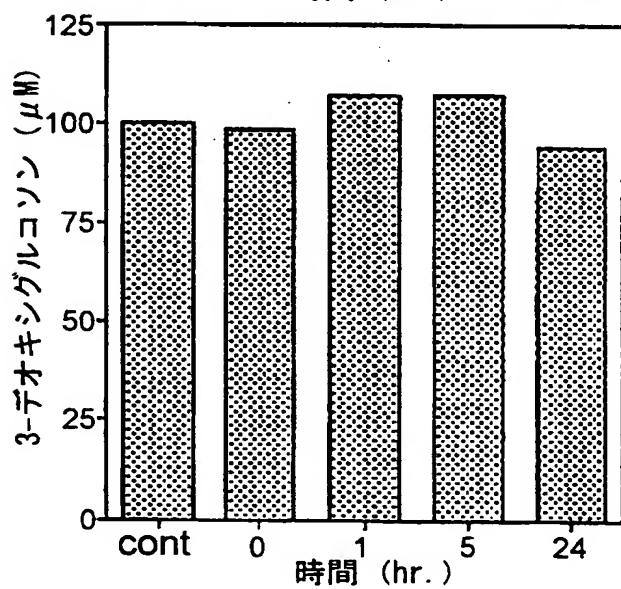
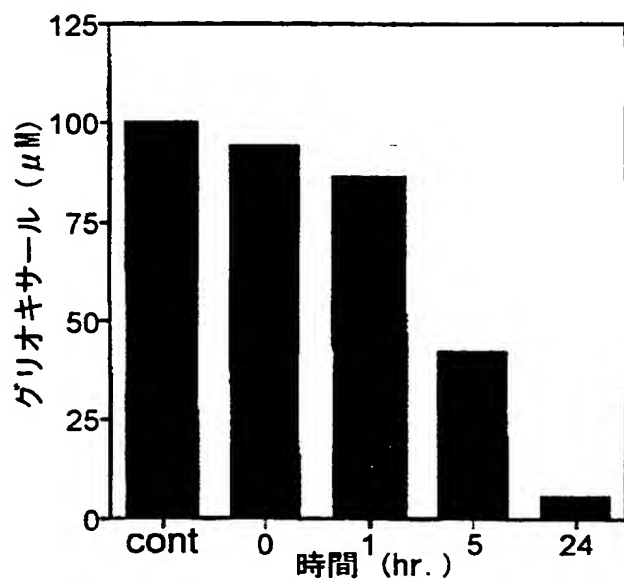
図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

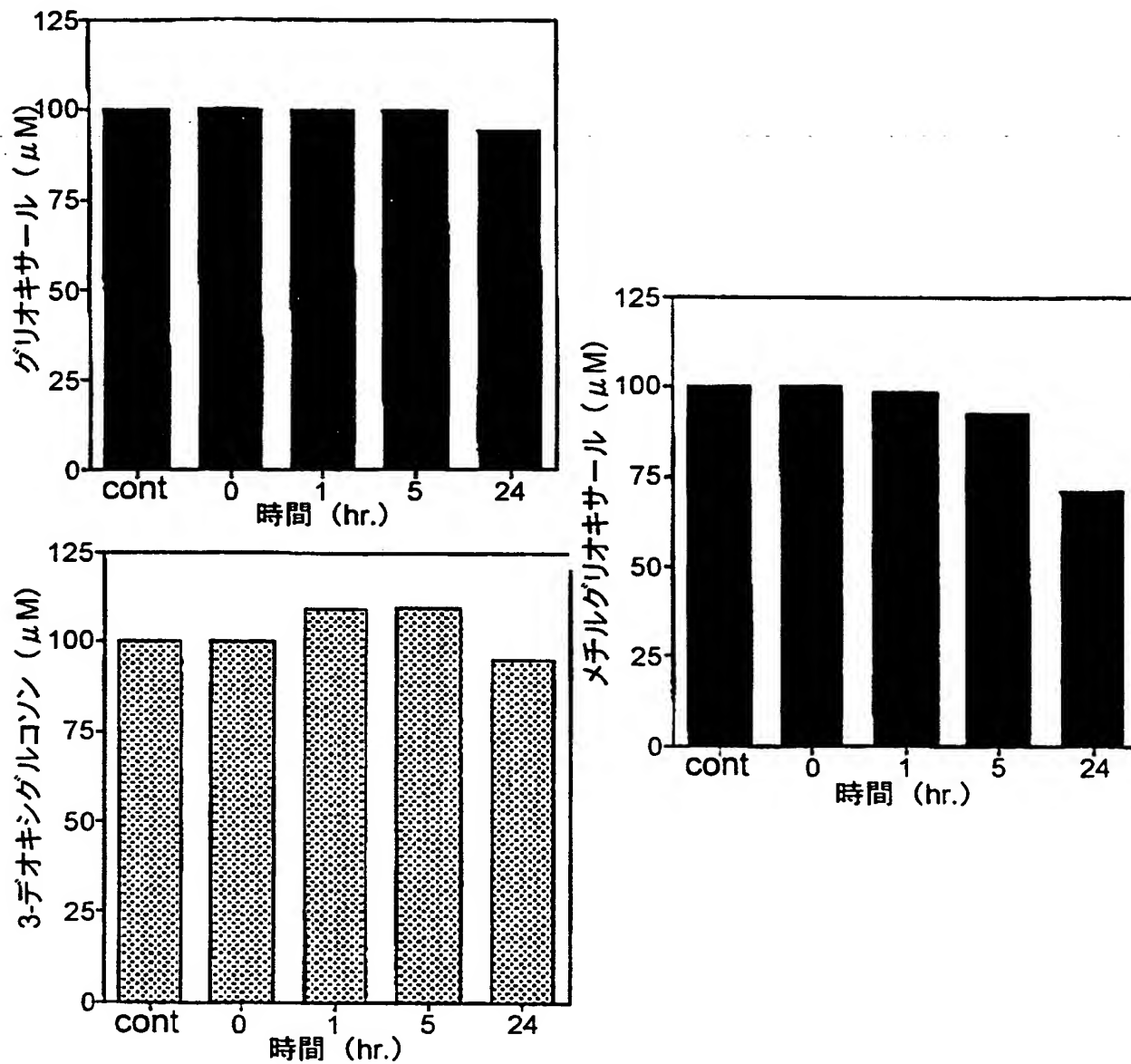
3 / 9

図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 4

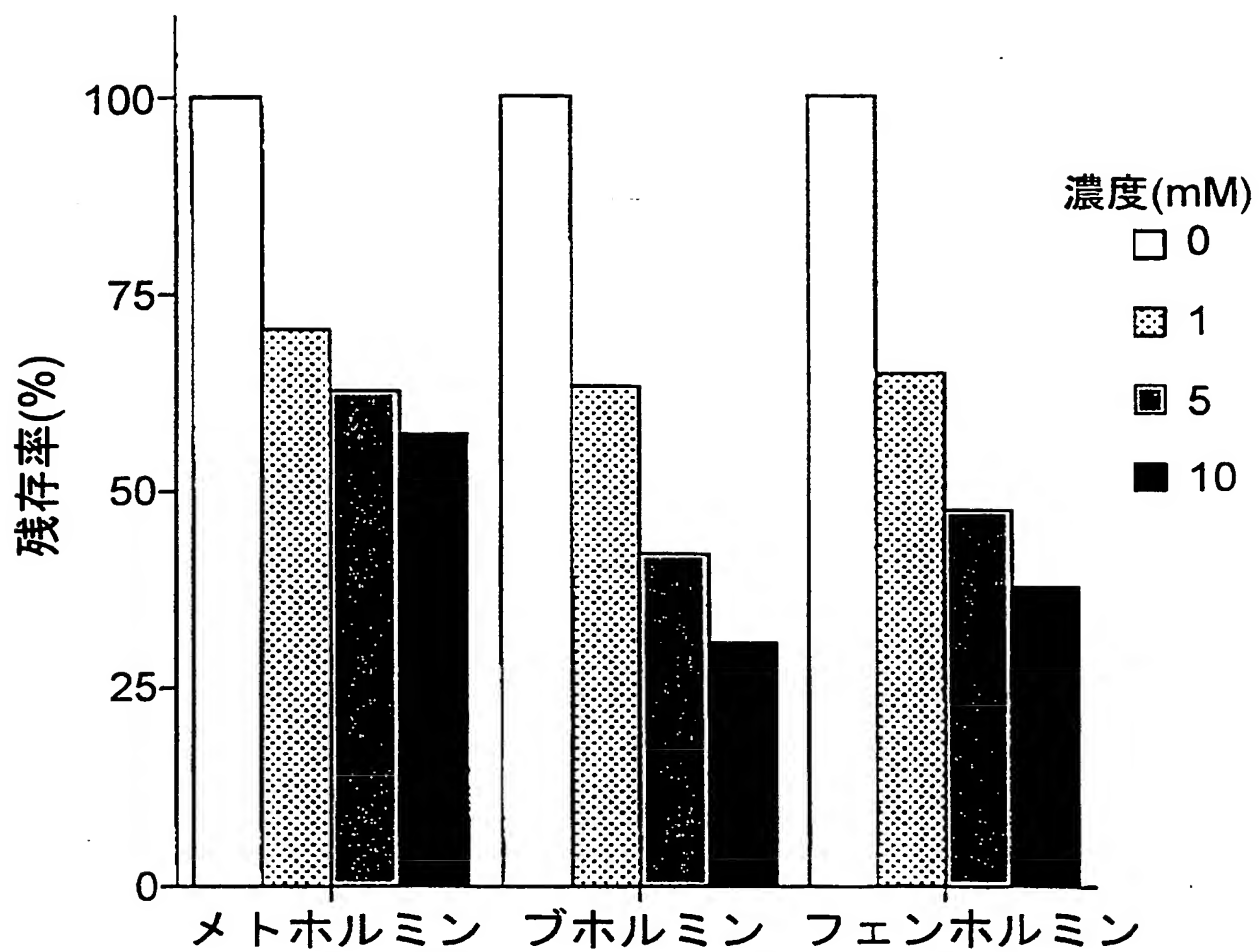


THIS PAGE BLANK (USPTO)



5 / 9

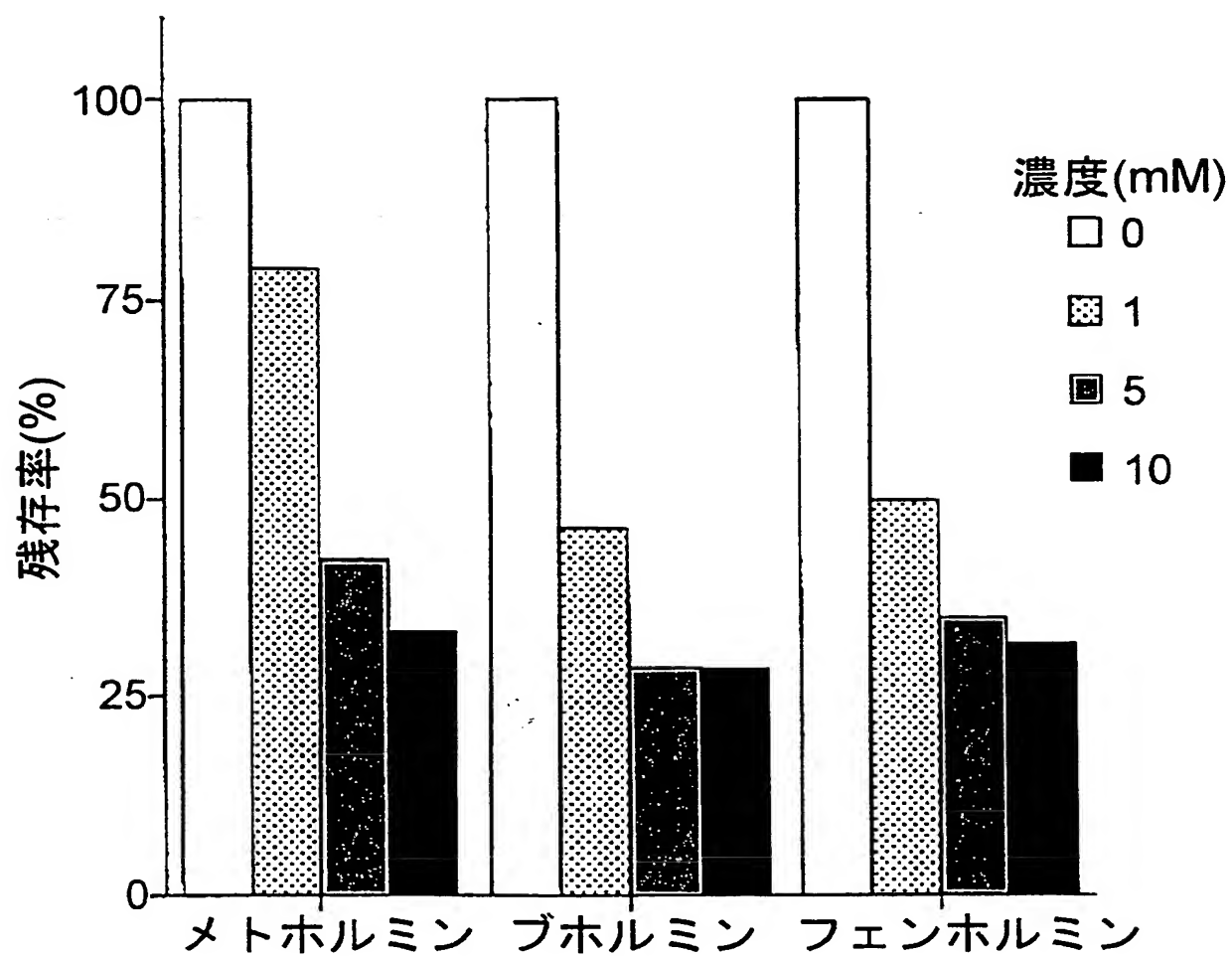
図 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 / 9

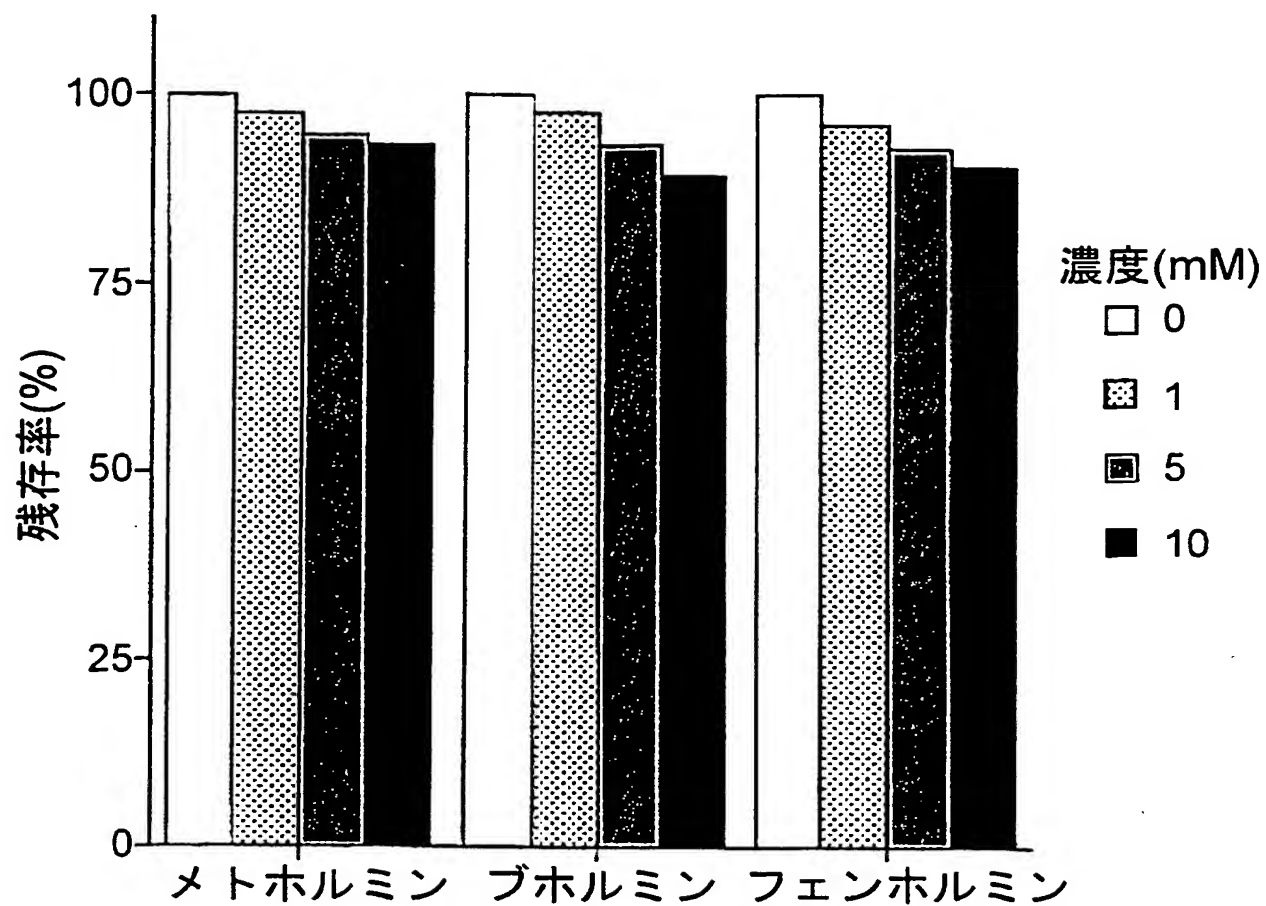
図 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

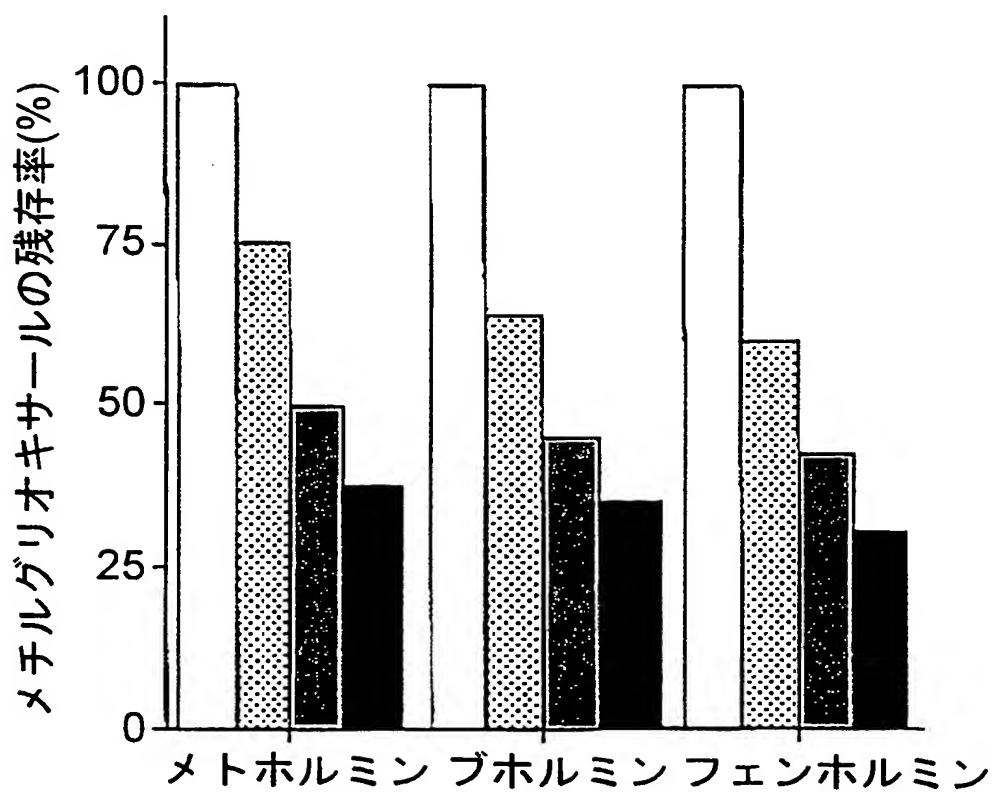
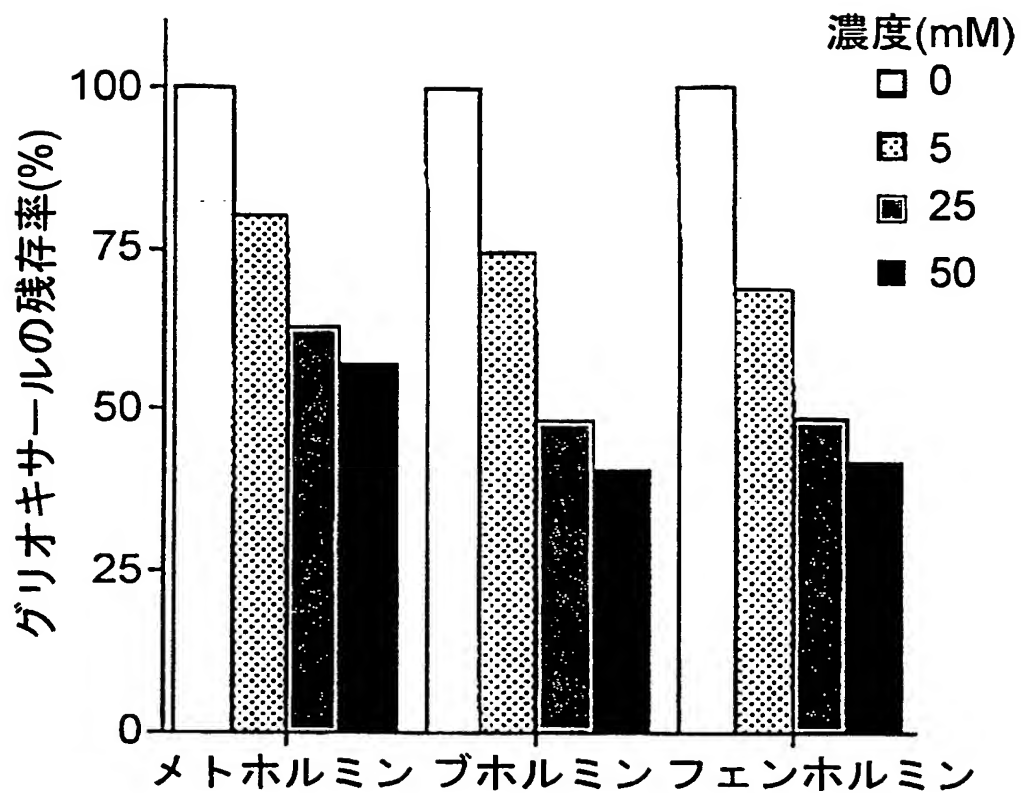
7 / 9

図 7



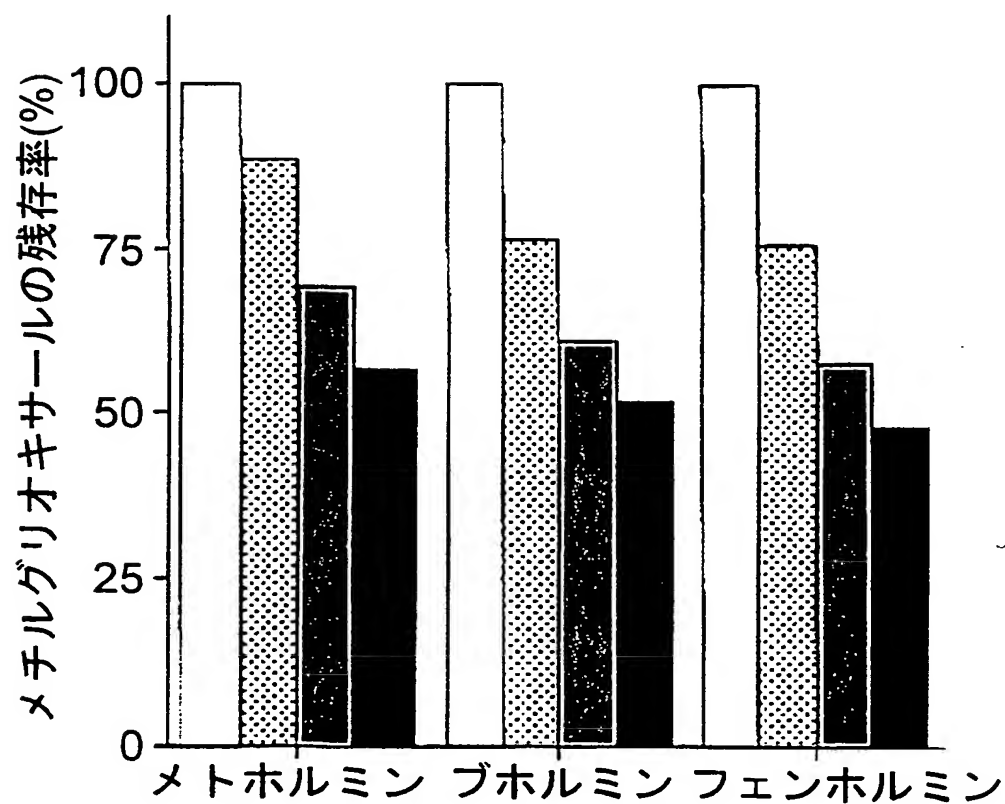
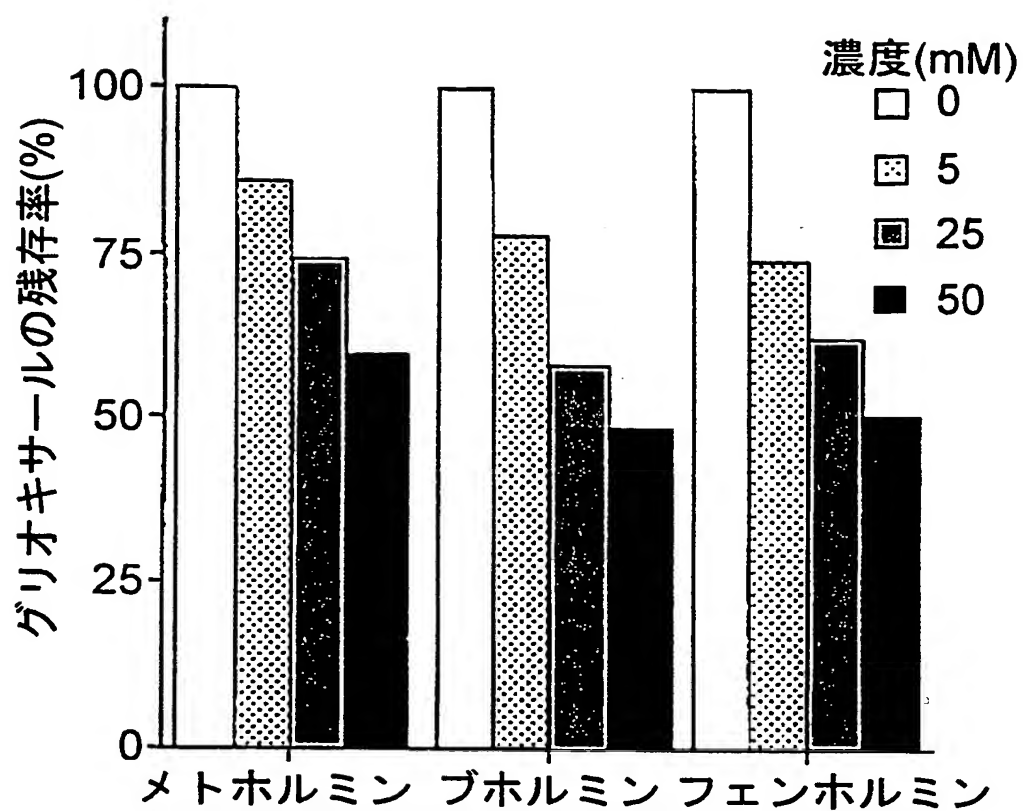
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 8



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 9



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06987

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K31/155, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/155, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TANAKA YASUSHI et al. "INHIBITORY EFFECT OF METFORMIN ON FORMATION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS," CURRENT THERAPEUTIC RESEARCH, VOL.58, NO.10 (1997) pp.693-697	1, 2
Y	YASUDA YOSHINARI et al. "CARBONYL STRESS. A NEW DEVELOPMENT OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS," GENDAI IGAKU, VOL.45, NO.2 (1997) pp.363-368	1, 2
X	G.T.LAYTON et al. "FACTORS INFLUENCING THE IMMUNOGENICITY OF THE HAPTENIC DRUG CHLORHEXIDINE IN MICE-PART I. MOLECULAR REQUIREMENTS FOR THE INDUCTION OF IgE AND IgG ANTI-HAPTEN ANTIBODIES," MOLECULAR IMMUNOLOGY, VOL.24, NO.2 (1987) pp.133-141	3
PX	WO, 00/10606, A1 (MIYATA TOSHIO), 02 March, 2000 (02.03.00) (Family: none)	1, 2
PX	DANIEL RUGGIERO-LOPEZ et al., "REACTION OF METFORMIN WITH DICARBONYL COMPOUNDS.POSSIBLE IMPLICATION IN THE INHIBITION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCT FORMATION," BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, VOL.58, NO.11 (1999)	1, 2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 December, 2000 (15.12.00)

Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06987

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim N .
A	pp.1766-1773 US, 4028402, A (Hoffmann-La Roche Inc.), 07 July, 1977 (07.07.77) & DE, 2542598, A & FR, 2287221, A & GB, 1473256, A & JP, 52-83906, A	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06987

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The present application involves the following two groups of inventions.
Claims 1 and 2: inventions relating to agents for relieving carbonyl stress which comprise biguanides as the active ingredient.

Claims 3 to 5: inventions relating to carriers having biguanides fixed thereon, use thereof and methods of using the same.

Although the inventions of claims 1 and 2 and the inventions of claims 3 to 5 have only one matter in common, i.e., biguanides, biguanides had been publicly known. Accordingly, the two groups of inventions cannot be recognized as being in a relationship of having in common a special technical feature exceeding the prior art. Such being the case, these two groups of inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61K31/155, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A61K31/155, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	TANAKA YASUSHI et al. "INHIBITORY EFFECT OF METFORMIN ON FORMATION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS," CURRENT THERAPEUTIC RESEARCH, VOL. 58, NO. 10 (1997) pp. 693-697	1, 2
Y	YASUDA YOSHINARI et al. "CARBONYL STRESS. A NEW DEVELOPMENT OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS," GENDAI IGAKU, VOL. 45, NO. 2 (1997) pp. 363-368	1, 2
X	G. T. LAYTON et al. "FACTORS INFLUENCING THE IMMUNOGENICITY OF THE HAPTENIC DRUG CHLORHEXIDINE IN MICE-PART I. MOLECULAR	3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

今村 玲 英 子 印

4 C

8 5 1 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	REQUIREMENTS FOR THE INDUCTION OF IgE AND IgG ANTI-HAPTEN ANTIBODIES," MOLECULAR IMMUNOLOGY, VOL. 24, NO. 2 (1987) pp. 133-141	
PX	WO, 00/10606, A1 (MIYATA TOSHIO) 2. 3月. 2000 (02. 03. 00) (ファミリーなし)	1, 2
PX	DANIEL RUGGIERO-LOPEZ et al. "REACTION OF METFORMIN WITH DICARBONYL COMPOUNDS. POSSIBLE IMPLICATION IN THE INHIBITION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCT FORMATION," BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, VOL. 58, NO. 11(1999) pp. 1766-1773	1, 2
A	US, 4028402, A (Hoffmann-La Roche Inc.,) 7. 7月. 1977 (07. 07. 77) & DE, 2542598, A & FR, 2287221, A & GB, 1473256, A & JP, 52-83906, A	1-5

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

この出願には、以下の2つの発明が含まれている。

請求項1-2: ビグアニド剤を有効成分とするカルボニルストレス改善剤に関する発明

請求項3-5: ビグアニド剤を固定化した担体、その用途、その使用方法に関する発明

請求項1-2の発明と請求項3-5の発明とは、ビグアニド剤のみを共通にしているが、ビグアニド剤は公知物であるから、上記2つの発明は先行技術を越える特別の技術的特徴を共有する関係にあるとは認められず、したがって単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとはいえない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

講座

(AGE 研究の新たな展開)

—(糖・脂質カルボニルストレスについて)—

安田 宜成*

宮田 敏男**

祖父江 元***

中島 泉†

内容紹介

糖尿病・動脈硬化・Alzheimer 病・腎不全等の種々の疾患に、糖と蛋白の非酵素的な反応により生成される advanced glycation end product (AGE) が関与していることが示唆され、精力的な研究が続けられている。本稿では、AGE という興味深い物質について紹介させていただくと同時に、AGE の概念を更に発展させたカルボニルストレス仮説について紹介する。

はじめに

近年、糖と蛋白の非酵素的な反応の結果生成する advanced glycation end product (以下 AGE と略す) が発見され、精力的な研究が行われている。当初 AGE は、糖との反応により生成

—Key words—

カルボニルストレス、後期糖化反応産物、糖酸化、脂質過酸化、酸化ストレス

* Yoshinari Yasuda:

東海大学内科・総合医学研究所、
名古屋大学大幸医療センター内科

** Toshio Miyata:

東海大学内科・総合医学研究所

*** Gen Sobue: 名古屋大学神経内科

† Izumi Nakashima: 名古屋大学免疫学

することから糖尿病の合併症や老化との関連について主に研究されてきた。しかし AGE は様々な物質の総称であることから、その物質個々によって生成過程が異なり、代表的な物質であるペントシジンやカルボキシメチルリジン (以下 CML と略す) 等は、その生成過程に酸化反応が重要であることが明らかとなる等、その概念自体が大きく変化してきている。

その中で私たちは AGE に関する多くの研究成果を基に、AGE を更に発展させたカルボニルストレス carbonyl stress 仮説を提唱している。これは生体内に豊富に存在する糖・脂質等が、酸化ストレスを受けて反応性の高いカルボニル構造を持った物質に変化し、生体の構成成分である蛋白や核酸を傷害することで各種の疾患の発症進展や老化現象に関わっているのではないかという仮説である。今回は私たちがこれまでに明らかにしてきた AGE の知見に加え、このカルボニルストレスについて紹介したい。

I. 蛋白糖化反応と AGE

AGE は蛋白と糖が非酵素的に反応した結果生成される最終産物の総称である。蛋白は生体内に存在する糖と反応することが知られているが、この蛋白糖化反応は、蛋白の N 末端アミノ酸の α -アミノ基またはリジン残基の ϵ -アミノ基が還元糖のカルボニル基を求核的に攻撃す

THIS PAGE BLANK (USPTO)

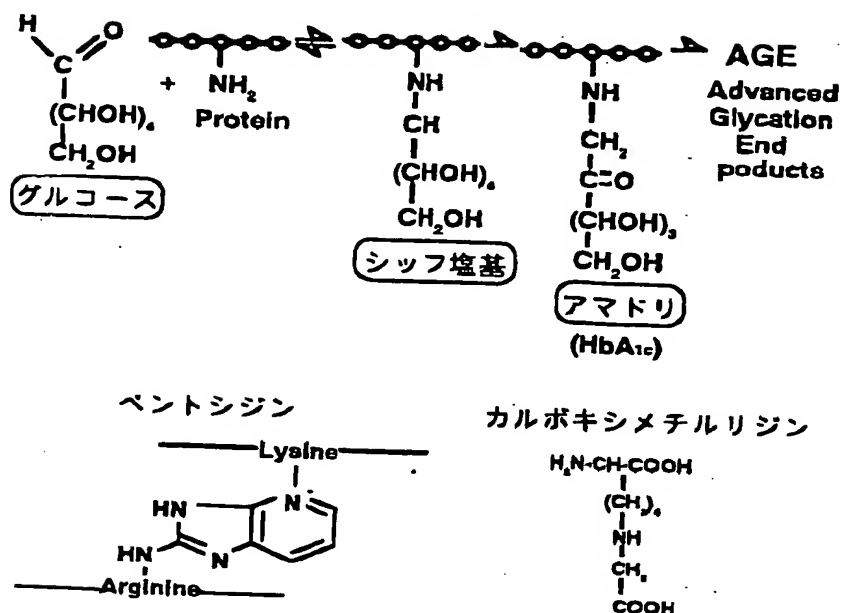


図1 メイラード反応とAGE

ることによって開始される。この反応により Schiff塩基が生成され、次いでケトースの誘導体に変換（アマドリ転移）されて、アマドリ化合物となる。これらの反応は蛋白糖化反応の初期段階 early stage と呼ばれている。私たちが糖尿病患者の血糖値コントロールの指標として測定しているグリコヘモグロビンやフルクトサミンはこれに相当する。アマドリ化合物以降の反応は、後期段階 advanced stage と呼ばれ、一連となった脱水反応や転移反応を繰り返す、最終的に褐色を呈する、蛍光を有する、分子架橋などにより重合するといった特徴を有する後期反応生成物である AGE が生成される (図1)。この反応は1912年、フランスの生化学者 L. C. Maillard によって初めて報告され、メイラード反応と呼ばれている。その後、蛋白糖化反応による褐色化は食品の品質形成等と深く関わっていることから主に食品科学者によって研究されてきた。しかし、1970年頃になると、血中グルコース濃度が増加する糖尿病患者において、過剰のグルコースと生体蛋白との間で蛋白糖化反応が促進される事実が明らかとなり医学分野で

も注目され、現在 AGE は動脈硬化、腎不全合併症、糖尿病合併症、Alzheimer 病、骨粗鬆症、白内障、関節リウマチ等の種々の疾患における関与が示唆されている。AGE は蛋白の構造を変化させる作用に加え、血管内皮などいくつかの細胞膜表面に特異的なレセプターが存在し種々の生理活性を持つことが報告されており、組織の再構築や種々の疾患の発症・進展に重要な役割を演じている可能性が考えられている¹⁻³⁾。

II. 腎不全と AGE

腎不全により、長期間透析治療を受けることで非常に高率に発症する透析アミロイドーシス dialysis related amyloidosis (以下 DRA と略す) という、アミロイドの沈着とそれによる骨・関節破壊を特徴とする合併症がある。近年 DRA のアミロイド構成成分が beta 2 microglobulin (以下 $\beta 2 m$ と略す) であることが明らかになり、精力的な研究が続けられているが、その原因は未だに明らかになっていない。

その中で私たちは DRA のアミロイドには AGE が存在することを初めて報告し、AGE の

THIS PAGE BLANK (USPTO)

持つ生理作用により DRA の骨・関節破壊が説明できるという可能性につき報告してきた¹¹⁾。しかし、DRA の発症率は糖尿病の合併の有無により差がないことが報告されていたことから、糖尿病と深く関連していると考えられていた AGE がなぜ透析患者で認められるのか、またなぜ糖尿病合併の有無による差がないのかという新たな問題が生じた。

私たちはこの矛盾を解決するために、AGE 構造の中で唯一正確な定量が可能であったペントシジンに注目して研究を進め、その結果、血中ペントシジン濃度は糖尿病患者で健常者に比して数パーセントという有意な高値を示したが、腎不全患者では何と健常者の数十倍という著明な蓄積が認められ、腎不全という因子の存在下では糖尿病という因子の影響による差は認められないことを明らかにした¹⁰⁾。実際にペントシジンは血糖値の指標あるフルクトサミンと相関がなく、腎不全における AGE 蓄積は血中のグルコース濃度では説明できない。また腎不全では β 2 M のように健常者と比較して数十倍の蓄積が認められる物質も存在するが、ペントシジンはその 95% 以上が血中のアルブミンに結合して存在する¹⁰⁾ことから、健常者でも糸球体での濾過を受けず、糸球体濾過能の低下も腎不全におけるペントシジン蓄積の原因ではないことが明らかになっている。これまで糖尿病との関連が考えられてきた AGE は、実際には腎不全で蓄積していることが明らかになったわけであるが、その後の検討から CML においてもペントシジンと同様な結果が得られており、またクロスリンという AGE も腎不全での蓄積が報告されている。

現在、腎不全における AGE 蓄積の原因は明らかになっていないが、ペントシジンの生成には酸化ストレスが重要であり、腎不全が酸化ストレスの増大した状態である¹¹⁻¹⁴⁾ことから、この酸化ストレスがペントシジン蓄積の原因ではないかとの仮説の基に検討を進めている¹⁰⁾。

III. AGE と酸化ストレス

最近、種々の研究成果から AGE というこれ

までの概念が変化を余儀なくされつつある。ペントシジンや CML 等の AGE ではその生成過程に酸化反応が必須で、糖化反応ではなく糖酸化 (glycoxidation) 反応物質であると考えられている。実際に *in vitro* で CML やペントシジンは酸素存在下では生成が著明に抑制されることが報告されている^{15,17)}。また、糖由来と考えられていた AGE は糖以外のアスコルビン酸等の物質からも生成され、CML に至ってはアラキドン酸等の脂質が生体内での主要な生成源ではないかと報告されている¹⁸⁾。私たちの検討でも *in vitro* でウシ血清アルブミンをグルコース、アラキドン酸、アスコルビン酸と 37°C で反応させると、CML はアスコルビン酸からの生成が最も多く、次いでアラキドン酸、グルコースの順となり、ペントシジンもアスコルビン酸がグルコースよりも生成量が多い結果が得られた。またアスコルビン酸との反応ではこれまでその生成には長期間 (蛋白とグルコースを *in vitro* で 1-2 ヶ月反応させると AGE が生成する) 必要と考えられていた AGE が 2 日程度の短期間で生成されることも明らかになった。確かに AGE のうち酸化反応が関与しないと考えられる物質もあるが、AGE の主要な構成物質と考えられてきたペントシジンや CML が、糖化反応と言うよりは糖酸化反応により生成されること、糖以外の物質の関与も大きいことから、これまでの AGE の概念は大幅な修正が必要となっている。今後は AGE を一括して扱うのではなく、各構成物質間の性質の差による新たな分類が必要になってくるであろう。

IV. AGE からカルボニルストレスへ

AGE の生成過程では、グリオキサール、メチルグリオキサール、アラビノース、3 デオキシグルコゾン等のカルボニル構造を持った物質が中間産物として生成される。AGE 自身は生体内で非常に安定に存在するが、中間産物であるカルボニル化合物は反応性が高く、蛋白を修飾し構造変化等の傷害を引き起こす。腎不全では AGE が蓄積しているが、透析前後の血清を蛋白と反応させ比較した検討により、AGE のみでは

THIS PAGE BLANK (USPTO)

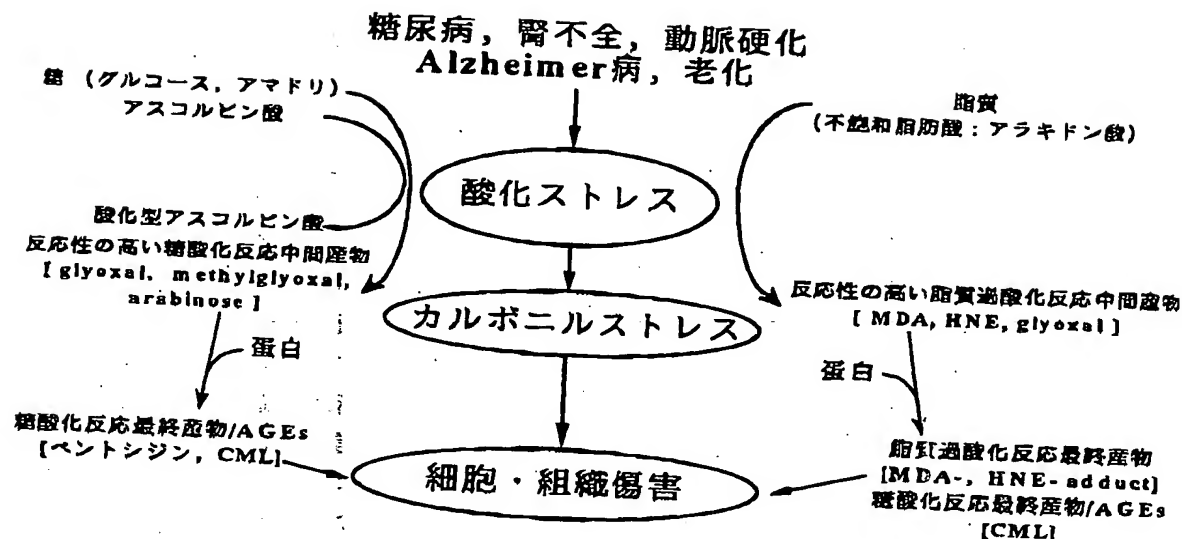


図2 カルボニルストレス仮説

なく低分子量のカルボニル化合物も蓄積していることが示唆されており、カルボニル化合物の蓄積が腎不全で認められる種々の合併症発症・進展に関与する可能性が示唆される。

しかし、酸化ストレスによる影響は糖に特異的な反応ではなく、生体内に豊富に存在する他の物質も影響を受けると考えられる。脂質が酸化ストレスを受けて生成される過酸化脂質分解産物は蛋白を修飾するが、その結果生成されるアルキル修飾蛋白は難消化性で生体内に長期間存在する。これは AGE の生成過程で見られるメイラード反応に酷似しており、その結果生成される脂質由来の最終産物が AGE に相当すると考えられる。そして糖・脂質ともに酸化ストレス下で生成される中間産物は、カルボニル構造を有しており、反応性が非常に高く、蛋白などを修飾することで組織傷害を引き起こす可能性が示唆される。実際に脂質由来のカルボニル構造である hydroxynonenal (以下 HNE と略す) は強い毒性を有しており、動脈硬化や腎癌の発症に関与していると報告されており^{19,20)}, malondialdehyde (以下 MDA と略す) も動脈硬化の発症進展への関与が考えられる酸化 LDL (low density lipoprotein) 上に存在すること

等から、その関与が示唆されている^{19,21)}。実際に腎不全では AGE の蓄積だけではなく、脂質過酸化物質である MDA 修飾蛋白も同時に増加しており、酸化ストレスによる影響が糖・脂質に同時に働いていることが推測される。

カルボニル化合物の生体内での病態生理学的意義はまだ十分には明らかにされていないが、カルボニル修飾による構造変化による作用に加え、近年カルボニル構造であるアルデヒドが細胞膜表面のレセプターを修飾することで細胞内へのシグナル伝達を起こすと報告されている²²⁾。私たちもカルボニル化合物によるシグナル伝達について検討しているが、糖・脂質のそれぞれから生成されるカルボニル化合物でシグナル伝達認められており、現在その病態生理学的意義について検討を進めている。

これらの報告等から、生体内に豊富に存在する糖・脂質が酸化ストレスにより反応性の高いカルボニル化合物へと変化し、蛋白やさらには核酸を修飾することを介して細胞・組織傷害を引き起こしている(これを私たちはカルボニルストレスと提唱している)と考えられ、私たちはこのカルボニルストレスが腎不全合併症以外にも糖尿病合併症、動脈硬化、Alzheimer 病、

THIS PAGE BLANK (USPTO)

関節リウマチ等の疾患や老化現象に広く関与しているのではないかと考えている (図2)。

V. カルボニルストレスと疾患

これまでの私たちの検討で、腎不全におけるカルボニルストレスが確認されたが、他の疾患にカルボニルストレスは存在するのだろうか。カルボニル化合物は反応性が高いため非常に不安定であり、これまでカルボニル化合物に対する研究が進まなかったことの原因の一つもこの不安定さにある。そこで私たちはカルボニル化合物ではなく、カルボニル化合物が蛋白を修飾した結果生成される最終産物に注目し、糖由来カルボニル化合物の最終産物としては AGE であるペントシジン及び CML, また脂質由来のカルボニル化合物の最終産物としては HNE が蛋白を修飾して生成された HNE-adduct 及び MDA が蛋白を修飾して生成された MDA-adduct に注目し検討を行っている。

Alzheimer 病はその原因として酸化ストレスの関与も考えられているが、最近私たちは Alzheimer 病の海馬における免疫組織学的検討から、ペントシジン及び CML が Alzheimer 病で特徴的に増加するリポフスチンに局在していることを明らかにした^{23,24)}。リポフスチンは脂質過酸化物質由来と考えられ、MDA 存在の報告や、抗酸化剤であるビタミン E の欠乏により認められるセロイドとの類似性等から、Alzheimer 病の病変局所にもカルボニルストレスが存在することが示唆される。現在、動脈硬化、糖尿病合併症等についても検討を進められているが、病変局所においてペントシジン、CML、HNE、MDA が全て共存する結果が得られていることから、カルボニルストレスが種々の疾患の発症・進展に重要な働きをしている可能性が推測される²⁵⁾。またカルボニル化合物は蛋白以外の生体の構成成分を傷害する可能性もある。核酸を傷害するとすれば生体に重要な影響を及ぼすことが推測されることから、現在核酸などの他の生体構成成分に対するカルボニル化合物の関与についても研究を進めている。今後、カルボニルストレス除去による新たな疾患の予

防・治療法を確立するためにも、更にその病態生理学的意義を明らかにしていくことが必要である。

参 考 文 献

- 1) Brownlee M, Cerami A, Vlassara H : Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 318 : 1315-1321, 1988.
- 2) Kirstein M, Brett J, Radoff S et al : Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor : role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 9010-9014, 1990.
- 3) Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR et al : Cachectin / TNF and IL-1 induced by glucosylated proteins : role in normal tissue remodeling. *Science* 240 : 1546-1548, 1988.
- 4) Miyata T, Inagi R, Iida Y et al : Involvement of β 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis : Induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor- α and interleukin 1. *J Clin Invest* 93 : 521-528, 1994.
- 5) Miyata T, Taneda S, Kawai R et al : Identification of pentosidine as a native structure for advanced glycation end products in β 2-microglobulin forming amyloid fibrils in patients with dialysis-related amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 2353-2358, 1996.
- 6) Miyata T, Iida Y, Wada Y et al : Monocyte/macrophage response to β 2-microglobulin modified with advanced glycation end products. *Kidney International* 49 : 538-550, 1996.
- 7) Iida Y, Miyata T, Inagi R et al : β 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products induces interleukin-6 from human macrophages : Role in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 201 : 1235-1241, 1994.
- 8) Miyata T, Hori O, Zhang J-H et al : The receptor for advanced glycation end products mediates the interaction of AGE- β 2microbulin with human mononuclear phagocytes via an

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- oxidant-sensitive pathway : implications for the pathogenesis of dialy-related amyloidosis. *J Clin Invest* 98 : 1088-1094, 1996.
- 9) Miyata T, Notoya K, Yashida K et al : Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol* 8:260-270, 1997.
 - 10) Miyata T, Ueda Y, Shinzato T, et al : Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure : Renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J Am Soc Nephrol* ; 7 : 1198-1206, 1996.
 - 11) Miyata T, Wada Y, Cai Z et al : Implication of redox imbalance in accelerated formation of advanced glycation end products in renal failure patients. *Kidney International*, 51 : 1170-1181, 1997.
 - 12) Caneatrali F, Galli F, Giorgini A et al : Erythrocyte redox state in uremic anemias : effect of hemodialysis and relevance of glutathione metabolism. *Acta Hematol* 91 : 187-193, 1994.
 - 13) Yeung JH : Effects of glycerol-induced acute renal failure on tissue glutathione and glutathione-dependent enzymes in the rat. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 13 : 23-28, 1991.
 - 14) Kumano K, Yokota S, Go M et al : Quantitative and qualitative change of serum albumin in CAPD patients. *Adv Perit Dial* 8 : 127-130, 1992.
 - 15) Miyata T, Maeda K, Kurokawa K et al : Oxidation conspires with glycation to create noxious advanced glycation end products in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 12 : 255-258, 1997.
 - 16) Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW : Identification of N ϵ -carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 261 : 4889-4894, 1986.
 - 17) Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR : Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of protein by glucose : Identification of glucose and other carbohydrate as possible precursor of pentosidine in vivo. *J Biol Chem* 266 : 11654-11660, 1991.
 - 18) Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ et al : The advanced glycation end product, N ϵ -(carboxymethyl) lysine, is a product of lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem* 271 : 9982-9986, 1996.
 - 19) Uchida K, Toyokuni S, Nishikawa K et al : Michael addition-type-4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins : markers for atherosclerosis. *Biochemistry* 33 : 12487-12494, 1994.
 - 20) Toyokuni S, Uchida K, Okamoto K et al : Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 2616-2620, 1994.
 - 21) Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME et al : Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 84 : 1086-1095, 1989.
 - 22) Jhon Rodes. Covalent chemical events in immune induction : fundamental and therapeutic aspects. *Immunol Today* 9 : 436-, 1996.
 - 23) Takeda A, Yasuda T, Miyata T et al : Advanced glycation end products in aging and Alzheimer's disease brain. *Neurosci Letter* 221 : 17-20, 1996.
 - 24) Horie K, Miyata T, Yasuda T et al : Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine and carboxymethyllysine, in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 263 : 327-332, 1997.
 - 25) Horie K, Miyata T, Maeda K et al : Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. *J Clin Invest* (in press).

THIS PAGE BLANK (USPTO)